

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS
EXTRAÍDOS DE ALGAS EM LINHAGEM B16-F10 (MELANOMA MURINO)

CURITIBA
2016

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS
EXTRAÍDOS DE ALGAS EM LINHAGEM B16-F10 (MELANOMA MURINO)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª. Célia Regina Cavichiolo Franco
Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Bellan, Daniel de Lima

Avaliação dos efeitos biológicos induzidos por polissacarídeos extraídos de algas em linhagem B16-F10 (melanoma murino). / Daniel de Lima Bellan. – Curitiba, 2018.

97 p. : il. ; 30cm.

Orientadora: Célia Regina Cavichiolo Franco

Coorientador: Edvaldo da Silva Trindade

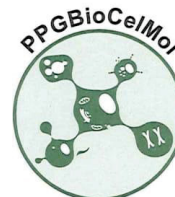
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma. 2. Polissacarídeos. 3. Alga verde. I. Título. II. Franco, Célia Regina Cavichiolo. III. Trindade, Edvaldo da Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.782

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



UFPR

ATA DA TRECENTÉSIMA NONAGÉSIMA QUARTA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Aos cinco dias do mês de Abril de dois mil e dezesseis, às 14h30min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Drs. Sheila Maria Brochado Winnschofer (Universidade Federal do Paraná), Katia Sabrina Paludo (Universidade Estadual de Ponta Grossa), e Célia Regina Cavichiolo Franco (Universidade Federal do Paraná, como orientadora e presidente da Banca Examinadora), com a finalidade de julgar a dissertação do candidato **Daniel de Lima Bellen**, intitulada: "Avaliação dos efeitos biológicos induzidos por polissacarídeos extraídos de algas em linhagem B16-F10 (melanoma murino)", para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O candidato teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco. Após analisar a dissertação e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela "APROVADO", habilitando-o ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Examinador/Afiliação


Parecer

Assinatura

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

APROVADO 

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnschofer
Universidade Federal do Paraná

APROVADO 

Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa

APROVADO 

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnschofer
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Suplente:

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná

Após arguir o mestrando **Daniel de Lima Bellan**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação dos efeitos biológicos induzidos por polissacarídeos extraídos de algas em linhagem B16-F10 (melanoma murino)", são de parecer favorável à aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 05 de Abril de 2016

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

Agradecimentos

Primeiramente agradeço às pessoas mais importantes da minha vida: meu pai e minha mãe, que sempre torceram, rezaram e me apoiaram incondicionalmente! Vocês são os meus exemplos de vida, e eu jamais vou conseguir expressar o quão sou grato por tê-los como pais!

Agradeço às minhas irmãs, Glaucia e Janaina, por cuidarem de mim a vida toda, por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus objetivos e por terem dado para nossa família as alegrias que se chamam Ingrid, Rafael e Isadora! Agradeço também aos meus cunhados João Edson e Anderson, por serem os irmãos que eu não tive! Agradeço também à Dona Inês, pelo carinho e torcida!

Agradeço à minha namorada, Fernanda, por permanecer do meu lado nos momentos felizes e de dificuldade, não deixando que eu desistisse dos meus objetivos quando eu já não acreditava que conseguiria!

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Célia Regina Cavichiolo Franco, pela oportunidade de trabalhar, aprender e conviver com ela. Poucos minutos de convivência são necessários para perceber o exemplo de vida que você é, Célia, e eu sou grato por ter tido a oportunidade de vivenciar isso!

Agradeço a meu coorientador, Professor Doutor Edvaldo da Silva Trindade, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais, e por todo o esforço que empregou e emprega diariamente para que eu e outras pessoas possamos desenvolver nossos trabalhos científicos!

Agradeço à Professora Doutora Carolina pelos ensinamentos e discussões de protocolo!

Agradeço ao Professor Doutor Hugo Alexandre, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por gentilmente ceder o polissacarídeo da alga *Codium isthmocladum* utilizado nesta dissertação.

Agradeço à Professora Maria Eugênia e a seu marido Miguel Nosedá, da Universidade Federal do Paraná, por gentilmente ceder o polissacarídeo da alga *Gayralia brasiliensis* utilizado nesta dissertação.

Agradeço aos amigos de laboratório pelas risadas e ajuda, aos que já saíram e aos que permanecem: Stelée, Gustavo, Jenifer, Thais, Malu, Ana, Fátima, Viviane,

Maíra, Bia, Fernanda, Cléber, Aline, Tabata, Fernando, Patrícia, Divino, Kátia e Bruno! Agradeço especialmente à Stelley, minha irmã científica, por ter me ensinado tanto do que sei hoje no laboratório! Ao Gustavo e a Jenifer, pela amizade e pela sempre disponibilidade em ajudar! À Thais e a Malu, pela amizade e ajuda na bancada!

Agradeço aos amigos de mestrado, Dandie, Gislene, Thaylise, Manu e Nilce!

Agradeço aos amigos da vida, peças tão importantes nessa caminhada: Emanuel, Izabela, Marcelo, André e Bruna!

Agradeço à Professora Sheila Winnischofer e à Professora Katia Paludo pelo tempo e paciência empregados nas correções dos relatórios de mestrado, assim como pelas sugestões feitas!

Agradeço à Professora Lucélia, por permitir de bom grado o uso dos equipamentos de seu laboratório!

Agradeço aos técnicos de microscopia do Centro de Microscopia Eletrônica e da Microscopia Confocal da UFPR pelo trabalho por eles realizado para essa dissertação!

Agradeço a todos os envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, da UFPR!

Agradeço às pessoas responsáveis pela limpeza das salas de laboratório e corredores do departamento e da UFPR!

Agradeço a todos os outros professores e colegas que fizeram e fazem parte do caminho que estou trilhando!

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pela incrível jornada que tive e estou tendo a oportunidade de vivenciar!

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária!

RESUMO

Nas três últimas décadas, o câncer vem alterando o perfil epidemiológico do país. Este evento caracteriza-se pelo aumento dos agravos e da mortalidade provenientes de doenças não transmissíveis, pelo aumento da expectativa de vida com números cada vez maiores de idosos em detrimento ao número de jovens, e por uma predominância da morbidade em relação à mortalidade, gerando grandes impactos no sistema de saúde e na economia. Apesar do conhecimento de que a luz Ultra Violeta é o principal fator ambiental relacionado ao câncer do tipo melanoma, modelo de estudo do presente estudo, os mecanismos pelos quais este deflagra a doença, bem como os componentes genéticos associados a esta patologia, não estão totalmente esclarecidos. A ciência busca compostos naturais para a cura de inúmeras doenças, e as pesquisas científicas têm sido intensificadas com o objetivo de investigar a ação farmacológica de diferentes produtos naturais, os quais tenham papel promissor no tratamento do câncer. Nosso objetivo é avaliar o potencial biológico de uma galactana sulfatada extraída da alga verde *Codium Isthmocladium* (CI), e de uma heteroramnana extraída da alga verde *Gayralia brasiliensis* (GB), em diferentes concentrações e tempos de tratamento, empregando ensaios *in vitro* com células das linhagem B16-F10 e RAW 264.7, melanoma e macrófago murino, respectivamente. Polissacarídeos com efeitos medicinais já foram e ainda são amplamente encontrados e descritos em fungos (majoritariamente em cogumelos), plantas, algas, animais e bactérias, sendo que a atividade desses compostos está intimamente associada a sua estrutura química, como composição monossacarídica, peso molecular e modificação de grupos funcionais. Entre suas diversas funcionalidades biológicas, são descritas atividades antitumorais através de inibição do crescimento tumoral, inibição de angiogênese, indução de apoptose, aumento de imunocompetência, diminuição de capacidade metastática e desencadeamento da perda de viabilidade celular. A galactana aqui estudada demonstrou diminuir a viabilidade celular (detectada pelo método de vermelho neutro) da linhagem em estudo no período de exposição de 72h em todas as concentrações testadas (1, 10, 100 e 1000ug/mL), não gerando comprometimento da atividade mitocondrial (ensaio de MTT) nas mesmas condições. Nos mesmos ensaios e condições de tratamento, a heteroramnana em estudo demonstrou comprometer a viabilidade celular e a atividade mitocondrial da linhagem B16-F10 nos três tempos testados (24, 48 e 72h) em pelo menos uma das concentrações. Ambos os polissacarídeos diminuíram a proliferação celular em 48h de tratamento. Com estes resultados, as concentrações de 10 e 100ug/mL e o tempo de tratamento de 72h foram escolhidos para o prosseguimento dos experimentos. Nestes parâmetros de tratamento, os polissacarídeos não comprometeram o potencial de membrana mitocondrial, além de não gerar arrasto do ciclo celular. A análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura apresentou alterações nas células tratadas com ambos os compostos. O ensaio de migração celular demonstra um promissor comprometimento dessa mecânica quando a linhagem B16-F10 foi exposta ao polissacarídeo GB. Entre as possíveis explicações para essa modulação, a marcação do receptor CD44 diminuiu de forma estatisticamente significativa frente ao tratamento com o polissacarídeo GB. Ambos os compostos aumentaram a marcação de CD54 e a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos, o que pode indicar diferenciação dessas células na ativação clássica M1. Assim, esses polissacarídeos apresentaram resultados promissores frente as linhagem em estudo, porém outros experimentos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para se identificar as biomoléculas envolvidas, bem como rotas e vias que possam estar sendo moduladas frente aos tratamentos com esses compostos.

PALAVRAS CHAVE: melanoma, polissacarídeos, *Codium isthmocladium*, *Gayralia brasiliensis*, B16-F10, RAW 267.4, algas verdes.

ABSTRACT

In the last three decades, cancer is changing the epidemiological profile of the country. This event is characterized by the increase in diseases and mortality from non-communicable diseases, increased life expectancy with increasing numbers of elderly people over the number of young people, and a predominance of morbidity in relation to mortality, generating major impact on the health system and the economy. Despite the knowledge that UV light is the main environmental factor related to cancer of the melanoma type, model of this study, the mechanisms by which this triggers the disease and the genetic components associated with this disease are not fully understood. Science seeks natural compounds for curing numerous diseases and scientific research has been intensified in order to investigate the pharmacological action of different natural products, which have promising role in treating cancer. Our goal was to assess the biological potential of an extracted sulphated galactan from the green alga *Codium isthmocladum*, and an extracted heterorhamnana from the green alga *Gayralia brasiliensis*, both at different concentrations and treatment times (exposure), using in vitro assays with murine melanoma cells B16-F10 lineage and RAW 264.7 macrophage lineage. Polysaccharides with medicinal effects are widely found and described in fungi (mainly in mushrooms), plants, algae, animals and bacteria, where the activity of these compounds is closely related to its chemical structure, such as monosaccharide composition, molecular weight and modification of functional groups. Among its various biological functions, antitumor activity are described by inhibiting tumor growth, inhibiting angiogenesis, induction of apoptosis, increased immunocompetence, decreased metastatic capacity and outbreak of loss of cell viability. The galactan studied here shown to decrease cell viability (detected by the neutral red method) of the lineage under study at 72h exposure period in all tested concentrations (1, 10, 100 and 1000µg/ml), and not generate impairment of mitochondrial activity (MTT assay) in the same conditions. In the same tests and conditions of treatment, the heterorhamnana under study demonstrated compromising cell viability and mitochondrial activity of B16-F10 line in the three times tested (24, 48 and 72h) in at least one of the concentrations. Both polysaccharides decreased cell proliferation at 48 hours of treatment. With these results, the concentrations of 10 and 100µg/mL and 72h treatment time were chosen for further experiments. In these treatment parameters, polysaccharides did not affect the mitochondrial membrane potential, as well as not to generate cell cycle arrest. The analysis of cell morphology in scanning electron microscopy showed changes in cells treated with both compounds. The cell migration assay demonstrates a promising commitment of this mechanic when the B16-F10 lineage was exposed to the polysaccharide GB. Among the possible explanations for this modulation, the immunostaining of the CD44 receptor statistically significantly decreased toward the treatment with the polysaccharide GB. Both compounds increased the immunostaining of CD54 and production of reactive oxygen species in macrophages, which may indicate differentiation of cells in classical activation (M1). Thus, these polysaccharides have shown promising results against the lineages under study, but other experiments in vitro and in vivo should be conducted to identify the biomolecules involved, as well as routes and signaling pathways that may be being modulated by the treatments with these compounds.

KEYWORDS : melanoma, polysaccharides, *Codium isthmocladum*, *Gayralia brasiliensis*, B16 -F10, RAW 264.7, green algae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Tipos de câncer mais incidentes.....	14
FIGURA 2 – Fases do processo de metástase.	18
GRÁFICO 1 – Ensaio de Vermelho Neutro.	49
GRÁFICO 2 – Ensaio de Vermelho Neutro.	50
GRÁFICO 3 – Ensaio de MTT.	50
GRÁFICO 4 – Ensaio de MTT.	51
GRÁFICO 5 – Ensaio de Proliferação Celular.....	54
GRÁFICO 6 – Ensaio de Proliferação Celular.....	54
GRÁFICO 7 – Potencial de membrana mitocondrial.	57
GRÁFICO 8 – Ciclo celular.	60
FIGURA 3 – Morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV).	63
GRÁFICO 9: Ensaio de Colônias.	65
GRÁFICO 10 – Migração celular.....	66
FIGURA 4 – Migração celular.	67
FIGURA 5 – Migração celular.	68
GRÁFICO 11: Migração celular.	73
FIGURA 6 –Migração celular.	74
GRÁFICO 12 – Imunomarcacão de NG2.	76
GRÁFICO 13 – Imunomarcacão de N-caderina.	77
GRÁFICO 14 – Imunomarcacão de CD44.	79
GRÁFICO 15 – Imunomarcacão de CD54.	82
GRÁFICO 16 – Detecção de ROS.....	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
1.1 CANCER	13
1.2 MELANOMA	15
1.3 METÁSTASE	17
1.4 ALVOS, BIOMOLÉCULAS E EVENTOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO TUMORAL	19
1.4.1 Receptores de Superfície Celular	19
1.4.2 Metaloproteinases	22
1.5 TRATAMENTO DO CÂNCER E PRODUTOS NATURAIS	25
1.5.1 Polissacarídeos em estudo	33
1.6 JUSTIFICATIVA	35
2. OBJETIVO	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Cultivo Celular	37
3.2 Diluição dos polissacarídeos	37
3.3 Viabilidade Celular – Vermelho Neutro	38
3.4 Citotoxicidade Celular – MTT	39
3.5 Proliferação Celular – Cristal Violeta	40
3.6 Potencial de Membrana Mitocondrial – Rhodamina 123	40
3.7 Ciclo Celular – Kit PI/RNase	41
3.8 Análise Morfológica e Ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
3.9 Ensaio de formação de colônias	43
3.10 Dinâmica de Migração Celular	44
3.11 Imunomarcações em citometria de fluxo	46
3.12 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) – Macrófagos (RAW)	46
3.13 Análise Estatística	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Viabilidade e citotoxicidade celular – MTT e Vermelho Neutro	48
4.2 Proliferação Celular – Cristal Violeta	53
4.3 Potencial de Membrana Mitocondrial – Rhodamina 123	56
4.4 Ciclo Celular – Kit PI/RNase	59
4.5 Análise Morfológica – Microscopia Eletrônica de Varredura	60

4.6 Ensaio de formação de colônias	64
4.7 Migração	65
4.8 Imunomarcacão – NG2	75
4.9 Imunomarcacão – N-caderina	76
4.10 Imunomarcacão – CD44	78
4.11 Imunomarcacão e ROS em macrófagos	80
4.11.1 Imunomarcacão em macrófagos – CD54	81
4.11.2 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) - Macrófagos	83
5. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 CANCER

A organização tecidual característica dos metazoários permitiu grande diversificação anatômica. Parte dessa plasticidade deve-se ao complexo sistema de controle gênico que permite que células com o mesmo genoma se diferenciem e proliferem, gerando estruturas únicas, promovendo o crescimento e o reparo de lesões. O controle de acesso às capacidades proliferativas tem de ser extremamente preciso, e erros nesse sistema podem dar início à multiplicação descontrolada de uma célula, a qual sai da conformação usual de seu tecido de origem, gerando um corpo estranho, um tumor (WEINBERG, 2014).

A compreensão de que tumores são originados a partir dos tecidos do próprio corpo é hoje óbvia, e o conjunto de mais de 100 doenças que podem surgir a partir desses aglomerados de células, o câncer, é atualmente a segunda maior causa de mortes no mundo. A origem dessa patologia pode ser traçada até uma única célula inicial, sendo que a linhagem desta acumulou danos que escapam do sistema de reparo do DNA e alterações epigenéticas (como a metilação de DNA, modificação de histonas e remodelamento de cromatina), resultando na ativação de oncogenes e/ou o silenciamento de supressores tumorais, induzindo à formação de um tumor. Esta patologia pode ser denominada benigna quando as células não invadem outros tecidos, sendo possível a remissão completa, na maioria das vezes através da destruição ou extirpação cirúrgica da massa tumoral. Será considerado câncer somente se for maligno, onde as células adquirem a capacidade de invadir e até mesmo colonizar órgãos e tecidos vizinhos e/ou distantes, processo conhecido como metástase, dificultando em muito o tratamento (SUDHAKAR, 2009; VAIIOPOULOS *et al*, 2014).

Em 2012, mais de 14 milhões de novos casos foram diagnosticados, com aproximadamente 8 milhões de óbitos associadas ao câncer. Nas últimas décadas essa doença assumiu *status global*, acometendo todas as populações em todos os países. A distribuição e as características clínicas das ocorrências registradas variam

enormemente entre as diferentes regiões, refletindo diferenças econômicas, culturais e sócio-ambientais: o câncer associado a infecções crônicas (como o de colo de útero) representa um grande desafio às nações em subdesenvolvimento e desenvolvimento, sendo pouco significativo nos locais de maior poder econômico, segundo o último relatório disponibilizado pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 2014).

Entre homens e mulheres os cinco tipos de cânceres mais diagnosticados no ano de 2012 foram o de pulmão, colo retal e estômago. Para os homens destaca-se ainda o câncer de próstata e fígado, e para as mulheres o câncer de mama e colo de útero. Em ambos os sexos essas foram as formas da doença que mais levaram ao óbito. O gráfico abaixo (Figura 1) representa as maiores incidências dos diferentes tipos de câncer em ambos os sexos para todas as idades, no ano de 2012 (omitindo os casos de câncer de pele) (IARC, 2014).

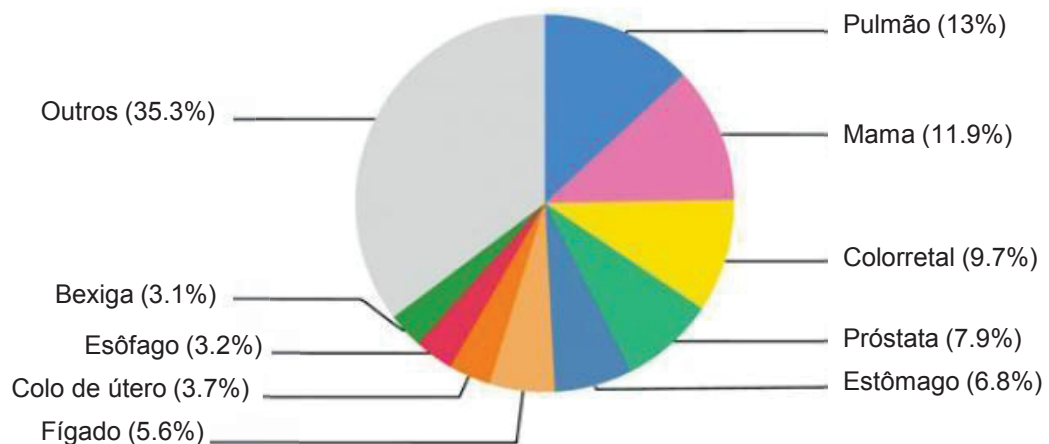


FIGURA 1 – Tipos de câncer mais incidentes. Formas mais prevalentes de câncer diagnosticadas em 2012, em ambos os sexos e para todas as idades. Neste ano, estima-se que mais de 14 milhões de novos casos foram diagnosticados (FONTE: Adaptado de *World Cancer Report*, IARC 2014).

Nas três últimas décadas, o câncer vem alterando o perfil epidemiológico do país. Este evento caracteriza-se pelo aumento dos agravos e da mortalidade provenientes de doenças não transmissíveis, pelo aumento da expectativa de vida com números cada vez maiores de idosos em detrimento ao número de jovens, e por predominância da morbidade em relação à mortalidade, gerando grandes impactos no

sistema de saúde e na economia. Atualmente o câncer é a segunda maior causa de mortes da população brasileira, tendo sido responsável por 17% dos óbitos com razão conhecida em 2007, com expectativa de 576 mil novos casos em 2014 (INCA,2014).

Existem dois tipos de câncer de pele: o melanoma e o não melanoma. O câncer denominado não melanoma representa tumores de diferentes linhagens, sendo as formas mais freqüentes as de carcinoma basocelular (70%) e o carcinoma epidermóide (25%). Este é o mais freqüente no Brasil, e é o de menor mortalidade (INCA, 2014).

O câncer de pele do tipo não melanoma é o tumor mais incidente em seres humanos, afetando todas as etnias, grupos socioeconômicos e regiões geográficas, podendo ocorrer em qualquer fase de vida, sendo responsável por aproximadamente 95% das neoplasias de pele detectadas. Desde 1960, esta forma de câncer apresenta crescimento de incidência na ordem de até 8% ao ano. (DEMERS *et al*, 2005; INCA, 2014).

No Brasil, o tumor de pele não melanoma corresponde a 25% dos casos de câncer maligno detectados, sendo mais comum em pessoas com mais de 40 anos, portadoras de pele clara ou com doenças cutâneas prévias. A estimativa é de mais de 182 mil novos casos registrados em 2014 no país. O melanoma, modelo experimental deste estudo, corresponde a apenas 4% dos diagnósticos, porém é a forma mais grave, pois possui alta capacidade metastática e rápida progressão ao óbito. Clinicamente se enfatiza que cânceres quando em estado metastático avançado são insensíveis aos tratamentos clínicos, os quais acarretam diversos efeitos colaterais, com comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (INCA, 2014).

1.2 MELANOMA

Melanócitos são originados da diferenciação de células da crista neural durante o desenvolvimento embrionário, e através de um complexo sistema de sinalização e interação com queratinócitos, essas células presentes na camada basal da derme são capazes de produzir melanina, pigmento responsável pela coloração da pele e proteção contra radiação ultravioleta (CICHOREK *et al*, 2013).

O fator mais fortemente associado ao desenvolvimento do melanoma é ambiental: a radiação ultravioleta (UV), capaz de gerar danos ao DNA, mutações

genéticas, imunossupressão, estresse oxidativo e induzir respostas inflamatórias, processos diretamente envolvidos na progressão tumoral (GORDON, 2013). A luz solar está dividida em três espectros de onda: UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) e UVC (100 a 280 nm, a qual é filtrada pela camada de ozônio). UVA e UVB são portanto os principais responsáveis pelos danos celulares relacionados ao aparecimento deste tipo de câncer, gerando danos diretos ao DNA, mutações genéticas, estresse oxidativo e imunossupressão. Estudos mostram maior relação entre exposição a UVR e desenvolvimento de câncer em indivíduos com a pele clara e pessoas do gênero masculino (NARAYANAN *et al*, 2010; MULLIKEN, RUSSAK, RIGEL, 2012; GORDON, 2013).

Entre os fatores relacionados a maior incidência de câncer de pele em caucasianos está a composição da melanina produzida pelos melanócitos desses indivíduos. Este pigmento constitui-se de eumelanina (mais escura e de maior capacidade fotoprotetora) e feomelanina (mais clara), ambos derivados de dopaquinona. Sua produção ocorre em melanossomos, os quais são exportados para os queratinócitos, e a relação eumelanina/feomelanina é dependente da atividade da enzima tirosinase, regulada pelo pH melanossomal, o qual por sua vez é regulado pela via de sinalização do hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH). Pessoas de pele mais clara possuem maior quantidade de feomelanina, o que aumenta sua predisposição aos danos causados pela exposição ao sol (SHERER e KUMAR, 2010; SIMON *et al*, 2009).

Apesar do conhecimento do principal fator ambiental relacionado ao melanoma, os mecanismos pelos quais este deflagra a doença, bem como os componentes genéticos associados a ela, os alvos e vias de sinalização não estão totalmente esclarecidos. Fatores hereditários, modificações genéticas espontâneas e alterações epigenéticas (nomeadamente a metilação do DNA, seja através de hipermetilação de supressores tumorais ou hipometilação de oncogenes, bem como a acetilação de histonas) figuram entre os possíveis promotores desta doença (ZAIDI, DAY e MERLINO, 2008).

Entre as alterações genéticas mais comumente presentes temos mutações no gene CDKN2, responsável por codificar as proteínas supressoras tumorais p16 e p14

(ZAIDI, DAY e MERLINO, 2008). Demais fatores ambientais, socioeconômicos e fisiológicos modulam ou promovem o desenvolvimento desta doença. Dentre este, destacam-se o aumento de incidência de melanoma em regiões de baixa latitude; em grandes altitudes; maior prevalência nas populações de pele clara; uso de bronzeamento artificial; queimaduras pela exposição ao sol; pacientes com familiares acometidos pela patologia (RUSSAK e RIGEL, 2012).

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam aproximadamente 5.890 novos casos de melanoma em 2014 no Brasil. Em 2010, 1.507 pacientes foram a óbito devido a essa patologia (INCA, 2014).

O prognóstico deste câncer é favorável quando é detectado nos estágios iniciais, “*in situ*”, quando as células cancerosas ainda não invadiram além da membrana basal, não tendo acesso aos vasos sanguíneos e linfáticos, sendo possível a remoção do tumor. Os melanócitos quando inicialmente transformados são benignos, mas podem progredir para um tumor maligno. Quando em estágio de progressão tumoral (intensa proliferação celular), este tumor maligno apresenta duas fases de desenvolvimento, as quais podem levar à metástase. A fase de crescimento radial (RGP) caracteriza-se por lesão intra-epidérmica local na derme. Estas podem progredir para uma fase posterior denominada fase de crescimento vertical (VGP), com potencial metastático, caracterizando-se pela invasão das células tumorais na derme (melanoma invasivo). No estágio metastático, a expectativa de vida do paciente cai drasticamente, o qual apresenta tempo médio de vida menor que um ano, sendo que a estimativa de sobrevida para cinco anos é menor que 15%. Os locais mais recorrentes de metástase são o cérebro, pulmões e fígado (DUNKI-JACOBS *et al*, 2013).

1.3 METÁSTASE

É um processo complexo e ineficiente, no qual poucas células, que conseguem cumprir uma série de etapas, deixam o tumor primário, são transportadas pela corrente sanguínea e invadem e colonizam novos tecidos e órgãos. O novo local de crescimento tumoral é determinado por fatores mecânicos (como semelhança no padrão circulatório entre a região do tumor primário e a região do secundário) e similaridades moleculares (hipótese do “*soil and seed*”, de Stephen Paget em 1889). As células que deixam a

neoplasia inicial são heterogêneas, sendo este um dos motivos da resistência a tratamentos em cânceres metastáticos (CHAMBERS *et al*, 2002; FIDLER, 2003). A Figura 2 representa os passos do processo metastático.

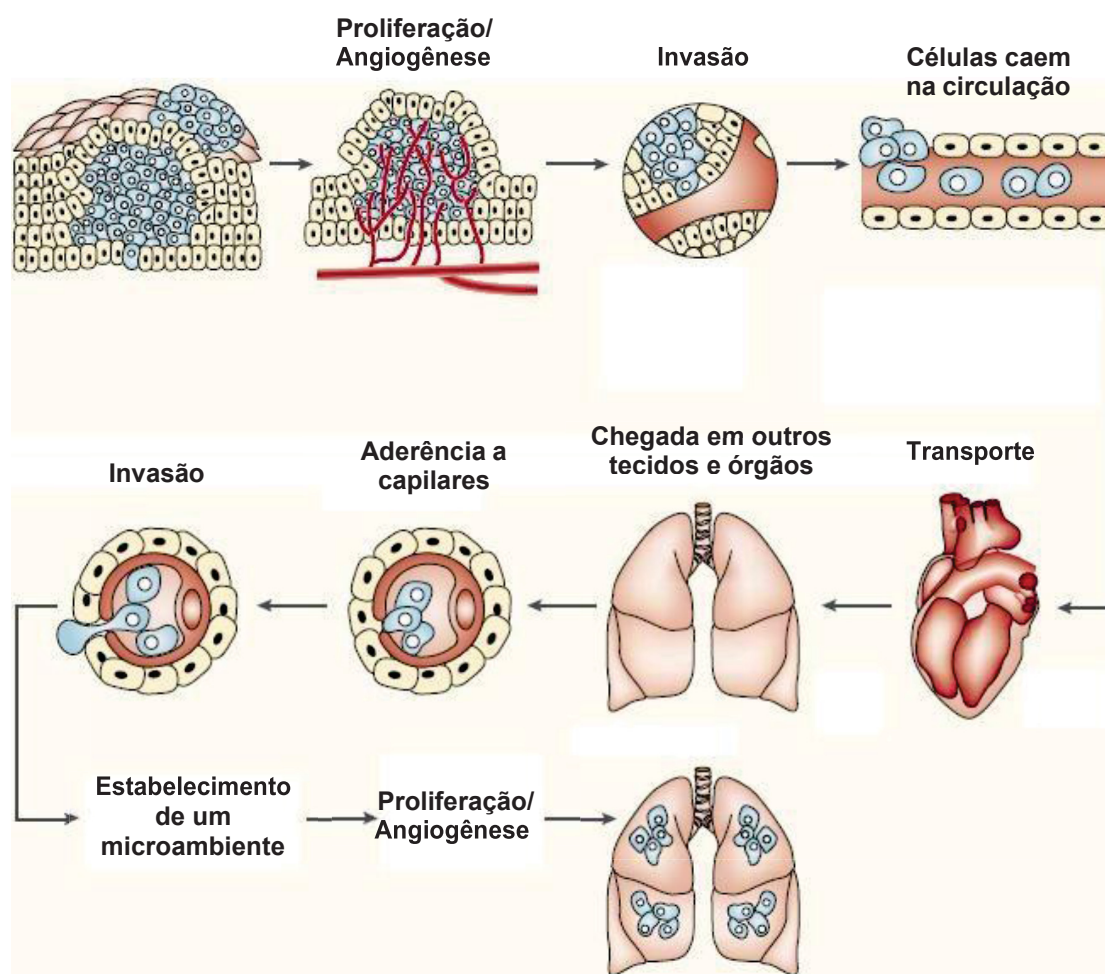


FIGURA 2 – Fases do processo de metástase. A intensa proliferação celular do tumor primário leva a secreção de fatores angiogênicos e metaloproteases, forma-se uma rede de capilares na massa tumoral, facilitando a invasão de tecidos vizinhos, respectivamente. Ao cair na circulação sanguínea, a maioria das células morrem, mas algumas poucas podem sobreviver nos capilares de órgãos distantes. Após degradar a matriz extracelular, estas podem invadir e colonizar o novo tecido. Caso a formação do microambiente tumoral seja bem sucedida, um tumor secundário terá sido estabelecido (Fonte: adaptado de FIDLER, 2003).

O processo de metástase é altamente complexo e envolve outras células do

microambiente tumoral, como por exemplo os macrófagos associados ao tumor (TAM).

O fenótipo metastático é adquirido através da expressão de diversos genes associados à motilidade celular, o que permite que o tumor responda a estímulos disponíveis no microambiente frente a invasão celular. A migração celular ocorre normalmente em movimentação sobre a matriz extracelular, em direção a quimioatratores, como o fator de crescimento endotelial (EGF), que chegam através de difusão dos vasos sanguíneos e por secreção de macrófagos. Estes liberam EGF e expressam receptores de fatores estimulantes de formação de colônia (CSF-1), enquanto que células cancerígenas expressam receptores de EGF e secretam CSF-1, atraindo mais macrófagos para o local (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005).

Uma importante fonte de células metastáticas está relacionada a uma mudança de fenótipo denominada transição epitélio-mesenquimal (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*), em que marcadores epiteliais – como E-caderinas, lamininas e entactinas – diminuem ou deixam de ser expressos, dando lugar a marcadores mesenquimais – como N-caderinas e certos dímeros de integrinas, como $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (KALLURI; WEINBERG, 2009).

1.4 ALVOS, BIOMOLÉCULAS E EVENTOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO TUMORAL

1.4.1 Receptores de Superfície Celular

A transformação celular com indução da malignização tumoral e progressão do melanoma envolve inúmeros eventos que modulam as metástases para viabilizar a migração das células para outros alvos teciduais. As células transformadas alteram o perfil de expressão de moléculas de adesão célula/célula e célula/matriz. Dentre as moléculas envolvidas destacam-se as caderinas e as β -cateninas, as quais ancoram as células epiteliais em junções aderentes. Em epitélios normais que não apresentam patologias, os melanócitos mantêm-se unidos aos queratinócitos, mantendo sua característica epitelial induzida pela expressão de E-caderina. Após transformação celular, os melanócitos diminuem ou não expressam E-caderina, e aumentam a expressão de N-caderina, induzindo perda do ancoramento (adesão) epidérmica e

adotando um fenótipo mesenquimal, bem como apresentando aumento de proliferação devido a presença de β -catenina livre. Esses eventos resultam em difusão dessas células pelo tecido, proporcionado pela falta de aderência, promovendo a penetração em vasos sanguíneos, migração para diferentes órgãos e estabelecimento de novas colônias (focos metastáticos) (WEELOCK *et al*, 2008).

Em situações não patológicas, os melanócitos e os queratinócitos mantêm interações que promovem a homeostase. A progressão tumoral envolve a perda deste equilíbrio, e ocorre através de supressão de receptores envolvidos na comunicação de melanócitos e queratinócitos, aumento da expressão de moléculas de interação entre células transformadas e fibroblastos, e alteração do padrão de expressão de moléculas de adesão célula-matriz. Além da perda de E-caderina, desmogleina 1 (um co-receptor de E-caderina) é suprimida, comprometendo a integridade dos desmossomos; N-caderina passa a ser expressa, o que aumenta a afinidade dos melanócitos a fibroblastos e células do endotélio vascular; ocorre aumento de expressão de integrinas, como a integrina $\alpha_5\beta_3$, aumentando a interação entre células malignizadas; e há desestruturação de *gap junctions*, devido a diminuição da expressão de conexinas, principalmente Cx43 (CHATELAIN; CIARLETTA; AMAR, 2011; HAASS e HERLYN, 2005).

Integrinas são proteínas heterodiméricas que recebem esse nome devido a sua função mediadora entre os componentes extra e intracelulares, conectando ligantes externos ao citoesqueleto e participando de vias de sinalização. Uma das suas funções mais bem conhecidas é a promoção da migração celular: formam-se adesões focais na porção anterior da célula em migração, as quais são constituídas de *clusters* de integrinas associadas aos filamentos de actina através de proteínas intermediárias, como a vinculina; esse pontos de adesão são conectados, através das integrinas, a componentes da matriz extracelular; a movimentação lateral desses contatos focais juntamente com a constante remodelação do citoesqueleto de actina permite a migração celular (WEHRLE-HALLER e IMHOF, 2003; LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007). O papel da integrina no câncer é amplamente estudado, sendo que diferentes heterodímeros de integrinas podem ser inibidos ou super expressos em diferentes tipos de câncer. A linhagem B16-F10 contém maior expressão de integrina α_v na superfície

celular, a qual é moduladora da interação com a matriz extracelular, especialmente a ligação com fibronectina. Esta integrina é recrutada para modular o processo metastático, bem como a sobrevivência celular em frente a morte por desadesão ao substrato, mecanismo denominado *anoikis* (QUIAN *et al*, 2005). Zhao e colaboradores (2008) mostraram uma correlação positiva entre inibição de integrina α_4 e diminuição da capacidade metastática e de adesão de células da linhagem B16-F10 em modelo *in vivo*, após tratamento com ácido gambóxico. Mizuno e colaboradores (2008) estudaram o efeito da expressão de duas variantes de integrina $\alpha_3\beta_1$ ($\alpha_{3A}\beta_1$ e $\alpha_{3B}\beta_1$) em células de carcinoma hepatocelular humano (linhagem HepG2), através de transfecção de cDNA, induzindo a maior produção desses receptores. Células transfectadas apresentaram maior adesão em laminina-5, maior capacidade migratória neste mesmo substrato e maior capacidade invasiva através de membranas também cobertas com laminina-5 (ZHAO *et al*, 2008; MINUZO *et al*, 2008).

Na embriogênese, a formação dos diversos órgãos e tecidos está relacionado à conversão de células epiteliais, imóveis e com alta interação inter-celular, em células mesenquimais, as quais possuem alta mobilidade e fraca interação célula-célula. Recentemente essa transição epitélio-mesenquimal (EMT, epithelial-mesenchymal transition) tem sido alvo de diversos estudos em oncologia devido a sua aparente relação com o aumento da capacidade invasiva, e por consequência capacidade metastática, em diversos modelos tumorais (YANG e WEINBERG, 2008).

A EMT inclui diversas modificações celulares e do microambiente tumoral, entre elas: células com características epiteliais perdem as interações célula-célula devido a modificações nos desmossomos (junções aderentes), resultantes da substituição de E-caderinas por N-caderinas; há reformulação do citoesqueleto e de receptores da superfície celular, em parte modulado pela maior expressão de proteínas da família Rho associadas a GTP (Rho-GTRases); há secreção de metaloproteases, tanto por células tumorais como por células do hospedeiro; ocorre nessas células grande produção de exossomos, vesículas recentemente associadas a sinalização com as células da vizinhança do tumor primário e com o tumor secundário, bem como com o remodelamento do microambiente tumoral, através da secreção de proteínas de adesão, miRNAs, e informação genética. Esses e outros processos auxiliam na

transição da morfologia celular e aumentam a capacidade invasiva das células cancerosas (VOULGARI e PINTZAS, 2009; MATHIAS; GOPAL; SIMPSON, 2012).

Portanto, a baixa expressão de E-caderina induz perda de adesividade das células tumorais, desestabilizando as adesões célula-célula via junções aderentes, aumentando a motilidade celular. Com a supressão de E-caderina, β -catenina livre induz proliferação celular e expressão de metaloproteases da matriz extracelular (MMPs), as quais são endopeptidases que clivam as proteínas que constituem a matriz extracelular, modulando a capacidade invasiva e migratória das células tumorigênicas (DANILOV *et al*, 2008; OUHTIT *et al*, 2009).

Células B16-F10 apresentam aumento da produção de proteases. Dentre essas destacam-se as MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, as quais degradam, entre outros substratos, o colágeno IV, maior integrante das membranas basais, resultando na capacidade invasiva das células, possibilitando ultrapassar barreiras teciduais, como a matriz extracelular e a parede vascular (KASAOKA *et al*, 2007).

1.4.2 Metaloproteinases

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são proteínas dependentes de íons metálicos (geralmente zinco), dependentes de ativação enzimática, capazes de degradar diferentes componentes da matriz extracelular, remodelando o ambiente tecidual, possuindo grande importância biológica no desenvolvimento dos seres vivos e em patologias. São reguladas em vários níveis, no controle da transcrição, na ativação por outros componentes celulares, durante a secreção e em sua degradação. Estão presentes mais ativas no microambiente tumoral do que em tecidos normais (STERNLICHT e WERB, 2001). A expressão é regulada por fatores de crescimento, citocinas, hormônios e oncogenes. A atividade das MMPs é altamente controlada no microambiente tumoral e é empregada no remodelamento da matriz, na promoção da angiogênese e da migração celular. Algumas MMPs atuam degradando inibidores de proteinases, como a inibidora de proteinase α_1 , permitindo assim a conversão de MMPs inativas em ativas. Outra forma de regulação é através de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por células inflamatórias presentes no ambiente tumoral. As ROS são capazes de oxidar o domínio de cisteína da MMP,

ativando-a (KESSENBROCK, PLAKS e WERB, 2010).

Uma das funções das MMPs no ambiente tumoral está em direcionar a invasão de tecidos adjacentes e as metástases. O fator de crescimento β (TGF- β) atua inicialmente como um supressor tumoral, promovendo a diferenciação celular. Com a progressão da doença, o acúmulo de mutações no gene que expressa o receptor desse fator torna as células tumorais irresponsivas a ele, porém este passa a ser usado pelas células cancerígenas para diminuir a vigilância do sistema imune nos tecidos adjacentes, facilitando a invasão e posterior metástase. O TGF- β é expresso em sua forma inativa, dependendo de ação proteolítica de outras proteínas para atuar. Estudos mostram que MMP-9 e MMP-2 são capazes de clivar e ativar TGF- β , sendo que em situações tumorais, ambas encontram-se amplamente concentradas em *clusters* na superfície celular, associadas aos receptores CD44 e integrina $\alpha_v\beta_3$ respectivamente, promovendo a capacidade invasiva e metastática (KESSENBROCK, PLAKS e WERB, 2010; YU e STAMENKOVIC, 1999).

1.4.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos (GAGs) são cadeias polissacarídicas formadas por dissacarídeos repetidos, sendo um destes sempre um amino açúcar, apresentando normalmente carga negativa devido a grupos sulfato e carboxila presentes nessas unidades repetitivas. Proteoglicanos são proteínas associadas a um número variado de GAGs de forma covalente. GAGs diferem de acordo com a unidade dissacarídica repetida que aprensetam e a geometria da ligação glicosídica entre essas. Podem ser não sulfatados (ácido hialurônico) ou sulfatados (heparam sulfato, condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e heparina). Exercem funções de adesão, crescimento, diferenciação e sinalização celular, além de propriedades anticoagulantes (GANDHI e MANCERA, 2008). Os Proteoglicanos de Heparan Sulfato (HSPG) estão presentes em todas as células animais, e atuam como moléculas de reconhecimento e de ativação para uma variedade de ligantes extracelulares. Os HSPG de superfície celular estão associados principalmente a duas famílias de proteínas: sindecans, proteínas transmembrânicas com alto conteúdo de prolinas, resultando em estruturas

extendidas; e glipicans, proteínas transmembrânicas globulares com um domínio conservado de 14 cisteínas, associadas a glicosil-fosfatidil-inositol (BERNFIEL *et al*, 1999).

Em processos tumorais, os HSPGs têm sido associados principalmente a sua participação na angiogênese tumoral. Fuster e colaboradores (2007) estudaram o efeito de alterações na sulfatação de HSPGs quanto a angiogênese de tumores pulmonares de Lewis e de melanoma (linhagem celular B16BL6), em linhagens de ratos manipulados para expressar menor atividade de N-acetilglucosamina N-desacetilase/Nsulfotransferases -1 (Ndst1), uma família de quatro proteínas associadas a modificações nesses proteoglicanos. Em ambos os tumores houve menor aumento de massa tumoral no grupo com comprometimento da atividade da Ndst1, bem como menor densidade microvascular (FUSTER *et al*, 2007).

Os pontos de adesão focal (pontos de contato entre as células e a matriz extracelular) regulam diversos aspectos celulares, como proliferação, diferenciação e migração. O HSPG sindecan 4 é constituinte e modulador destas adesões focais, podendo se ligar a moléculas da matriz extracelular, como a fibronectina (PETIT e THIERY, 2000). O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) é constitutivamente expresso em células de melanoma, modulando a progressão tumoral e o desenvolvimento de características metastáticas, tendo como receptores FGF-1, FGF-4 e HSPGs (MEIER *et al*, 2003). Chalkiadaki e colaboradores (2008) demonstraram o efeito do pré-tratamento com FGF- 2 em células de melanoma da linhagem M5, gerando significativa queda na expressão de sindecan-4, com conseqüente aumento da capacidade migratória e menor capacidade aderente dessas células sobre FN, o que pode estar associado a perda dos pontos de adesão focal. No mesmo estudo, células M5 tratadas com heparatinases (enzima que cliva heparam sulfato) apresentaram menor capacidade aderente e maior capacidade migratória sobre substrato de FN. Proteoglicanos da superfície celular de células tumorigênicas podem sofrer ação de enzimas proteolíticas denominadas shedases e heparanases secretadas pela própria célula. Esta ação cliva o ectodomínio destes PGs, ou atuam sobre as cadeias de GAGs, liberando PGs livres ou fragmentados, os quais podem atuar no alojamento tumoral. (CHALKIADAKI *et al*, 2008).

Os GAGs também exercem modulações celulares quando presentes na matriz extracelular, como é o caso do ácido hialurônico (HA), um dos principais componentes da matriz, presente na forma de alto peso molecular (HMW-HA), composto de dissacarídeos repetitivos com unidades de N-acetilglucosamina e ácido glucurônico, sendo CD44 o principal receptor de superfície celular para esse GAG (ARUFFO *et al.*, 1990). O ácido hialurônico é um importante determinante do comportamento das células tumorais. A elevada síntese de HA por essas células induz a formação de uma matriz tênue e densa, a qual propicia a mobilidade e a invasão tecidual. O receptor CD44 também atua no remodelamento da matriz através de regulação da disponibilidade de HA, promovendo a captação deste, modificando assim a dinâmica de migração celular (PONTA; SHERMAN; HERRLICH, 2003).

Expondo a linhagem de carcinoma pulmonar de Lewis a fragmentos de ácido hialurônico, Fieber e colaboradores (2003) mostraram aumento da produção de mRNAs codificantes de MMP-9 e MMP-13 em resposta a fragmentos pequenos de HA (menores do que 60 kDa). Em outro estudo, Voelcker e colaboradores (2007) utilizaram hialuronidases para gerar fragmentos de HA, os quais foram então adicionados a culturas de melanoma (linhagem Bro). Análises de PCR em tempo real mostraram que após 6 horas de exposição houve super-expressão de mRNAs codificantes para interleucina-8 (IL-8) e MMP-2 (resposta não encontrada quando as células foram expostas a HMW-HA). Ambos os estudos demonstram a capacidade de produção de moléculas que promovem o remodelamento do micro-ambiente tumoral em resposta a fragmentos de HA e sua interação com as células tumorais, sendo que muitos estudos apontam a capacidade de síntese de hialuronidases em diferentes células cancerígenas (STERN, 2008).

1.5 TRATAMENTO DO CÂNCER E PRODUTOS NATURAIS

O diagnóstico precoce, a ampliação do acesso à centros médicos e o desenvolvimento de novas terapias aumentou significativamente a possibilidade de cura e/ou sobrevida para pacientes com câncer, apesar de esta ainda ser a segunda maior causa de mortes no mundo (IARC, 2014).

A remoção cirúrgica continua sendo a forma mais efetiva no combate a tumores

primários sólidos, e o advindo da radioterapia e da quimioterapia permitiu um uso mais conservador e menos invasivo dessa forma de intervenção, obtendo-se resultados promissores através de tratamentos complementares envolvendo essas três técnicas. Além dessas abordagens, o crescente conhecimento do perfil molecular da célula cancerígena e do papel do microambiente tumoral vem permitindo o desenvolvimento de novas terapias contra a doença, como por exemplo através do uso de inibidores moleculares específicos, da modulação do sistema imune do paciente e do comprometimento da angiogênese do tumor (URRUTICOECHEA *et al*, 2010).

O tratamento do câncer torna-se muito mais complexo quando há a metástase do tumor primário, aumentando a relevância das terapias auxiliares à cirurgia, como a quimioterapia. Este tipo de abordagem baseia-se em causar danos ao ciclo celular, afetando mais intensamente células com alta taxa de divisão, havendo períodos de intervalo entre as intervenções para permitir a recuperação dos tecidos normais também afetados. Para maior taxa de sucesso, são administrados quimioterápicos com diferentes alvos moleculares, permitindo máxima sinergia do efeito antitumoral e mínima toxicidade pela associação de quimioterápicos. Porém, mesmo em terapias que utilizam um conjunto de medicamentos, pode haver desenvolvimento de resistência às drogas e/ou prevalência de sítios tumorais, seja por mecanismos celulares ou pela inadequada perfusão do tratamento no ambiente tumoral (GALMARINA *et al*, 2012; CALEY; JONES, 2012).

Assim como em outros tipos de câncer, o tratamento contra o melanoma baseia-se no estágio de desenvolvimento da doença. Tumores com até 2mm de espessura têm a remoção cirúrgica como procedimento mais adotado. A partir do estágio II (espessura maior do que 2mm e presença de metástases) adota-se o uso de terapias adjuvantes à excisão. Além do uso da quimioterapia e radioterapia, destacam-se o uso de algumas abordagens: interferon- α 2b (INF- α -2b), possui atividade imunomoduladora e antiangiogênica, apresentando resposta heterogênea na sobrevida dos pacientes e altos níveis de hepatotoxicidade; vemurafinib e dabrafenib, inibidores do gene BRAF, o qual participa da sinalização de proliferação celular, estando mutado em 40 a 70% dos melanomas, porém muitos tumores desenvolvem resistência a essa inibição; imunoterapias e vacinas, como o uso de interleucina-2, promovendo o reconhecimento

e ativação das células do sistema imune contra as células cancerígenas (GARBE *et al*, 2011; MAVERAKIS *et al*, 2015).

Existem atualmente mais de 30 drogas citotóxicas utilizadas no tratamento de tumores malignos. A falta de seletividade dessas drogas gera diversos efeitos colaterais, como a destruição de células do sistema imune, aparecimento de úlceras orais, diarreia, perda de cabelo, dano ao tecido nervoso e aos rins (IARC,2014).

A atuação de polissacarídeos no combate ao câncer foi primeiramente identificada há mais de 100 anos e descrita por Nauts e colaboradores em 1946. Em seu artigo, Nauts descreve relatos do médico William Coley fazendo uso do emprego de toxinas produzidas por bactérias em casos de câncer ditos como inoperáveis, resultando em remissão da doença e aumento de sobrevida de alguns pacientes (NAUTS *et al*,1946).

Polissacarídeos são moléculas longas formadas pela união de monossacarídeos através de ligações glicosídicas, resultando em estruturas lineares ou ramificadas. Muitos efeitos medicinais desses compostos já foram e ainda são amplamente encontrados e descritos na literatura, obtidos a partir de fungos (majoritariamente em cogumelos), plantas, algas, animais e bactérias. Entre suas diversas funcionalidades biológicas, são relatadas atividades antitumorais através de inibição do crescimento tumoral, inibição de angiogênese, indução de apoptose, aumento de imunocompetência, diminuição de capacidade metastática e perda de viabilidade celular (ZONG, CAO e WANG, 2012). A tabela (Tabela 1) abaixo apresenta alguns exemplos de fontes, modelos tumorais em que foram testados e efeitos de alguns polissacarídeos.

TABELA 1: Polissacarídeos extraídos de variadas fontes apresentam atividades antitumorais e imunoestimulatórias em diferentes modelos experimentais.

Espécie	Modelo Tumoral	Efeitos
Origem: Fungos		
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Tumor de Ehrlich em camundongos	Diminuição da produção de IL-10 induzida pelo tumor; alteração do microambiente tumora
<i>Inonotus obliquus</i>	Tumor induzido por linhagem B16-F10 em camundongos	Aumento da taxa de sobrevivência; inibição do crescimento tumoral; aumento de proliferação de macrófagos
Origem: Plantas		
<i>Cactus pear fruit</i>	Tumor induzido pela linhagem celular S180	Inibição do crescimento tumoral; indução de apoptose; aumento de atividade imunológica
<i>Gynostemma pentaphyllum Makino</i>	Linhagens celulares HepG2 e Hela	Inibição da proliferação celular; inibição da progressão do ciclo celular
Origem: Algas		
<i>Fucus evanescens</i>	Carcinoma pulmonar de Lewis induzido em camundongos	Efeito antimetastático; potenciação do efeito da ciclofosfamida
<i>Sargassum sp</i>	Linhagens celulares B16 e de carcinoma pulmonar de Lewis	Inibição da proliferação celular; indução de apoptose; aumento de atividade de células NK
Origem: Animais		
<i>Gekko swinhonis Guenther</i>	Linhagens celulares Bel-7420 e SMMC-7721 de hepatocarcinoma	Inibição de proliferação celular; inibição de migração celular através de regulação do citoesqueleto de actina
<i>Hyriopsis cumingii</i>	Linhagem celular HepG2	Inibição da proliferação celular; inibição da progressão do ciclo celular; indução de apoptose

(Fonte: adaptado de ZONG *et al*, 2012)

Novaes e colaboradores (2011) resumizam diversos artigos apresentando variadas ações farmacológicas de polissacarídeos em diferentes linhagens celulares, demonstrando que esses compostos ativam macrófagos, células T e células *natural killer* (NK); inibem a proliferação celular através de inibição de proteínas nucleares; diminuem a invasão e a migração de células cancerígenas; inibem neoangiogênese em tumores em crescimento; entre outros efeitos, demonstrando assim que essas moléculas biológicas têm efeitos sobre diferentes componentes celulares e podem ter

importante papel como coadjuvantes no tratamento contra o câncer (NOVAES *et al*, 2011).

Yu e colaboradores extraíram e caracterizaram uma β -glucana a partir do corpo frutífero de *Lentinus edodes*, e avaliaram possíveis atividades antitumorais deste polissacarídeo sobre um modelo *in vivo*, utilizando a linhagem celular de sarcoma 180. Os animais utilizados foram tratados por 20 dias alternados, resultando numa diminuição do crescimento tumoral na ordem de 61,3% em relação ao controle (YU *et al*, 2010).

Utilizando uma fração de polissacarídeos extraídos das raízes de *Salvia miltiorrhiza*, Wang e colaboradores demonstraram atividades anti-tumorais e imunoestimulantes desse composto em modelo *in vivo* de câncer gástrico. Ratos Wistar foram induzidos ou não a desenvolver o câncer, e foram então tratados ou não com o polissacarídeo diariamente por seis semanas, na dosagem de 200 mg/kg. Os animais tratados apresentaram maior proliferação de células do sistema imune em relação aos dois grupos controle (controle sem indução de câncer e controle com câncer induzido por carcinogênico), maior produção de interleucinas pró-imunológicas (IL-2, IL-4, IL-10, IgA, IgG e IgM) e maior atividade de células *natural killer* (NK) (WANG *et al*, 2014).

A inibição da progressão do ciclo celular e a indução a apoptose em ensaios *in vitro* com a linhagem celular de câncer pulmonar humano, A549, foi demonstrada por Yu e colaboradores, utilizando o extrato bruto de polissacarídeos obtidos do cogumelo *Auricularia polytricha*. Através do ensaio de MTT, a citotoxicidade do composto foi mensurada, permitindo estabelecer as concentrações de tratamento que não inviabilizavam as células (chegando ao intervalo de 25 a 200 μ g/mL de composto). Através de citometria de fluxo, evidenciou-se que o polissacarídeo promove parada do ciclo celular com significativo número de células em G0/G1 em relação ao grupo não tratado, assim como causa aumento da apoptose (48.14% no grupo controle contra 70.10% no tratado), verificado através do método de Anexina V-PI (YU *et al*, 2014).

Outra notória atividade de polissacarídeos sobre características tumorais diz respeito à inibição da migração de linhagens cancerígenas. Utilizando um composto extraído do fungo *Inonotus obliquus*, Lee e colaboradores demonstraram significativa diminuição da motilidade celular da linhagem B16-F10, a mesma utilizada na presente

dissertação, frente aos tratamentos, detectada pelo ensaio de *wound healing*, além de verificar significativa queda na capacidade invasiva e na atividade das MMPs 2 e 9 em relação ao grupo controle (LEE *et al*, 2014). Em outro modelo, extratos alcóolicos obtidos do cogumelo *Pleurotus ferulae* demonstraram diminuir a migração da linhagem celular B16-F10 de forma concentração dependente após 24 horas de tratamento, com concentrações de 0.4, 0.8 e 1.6 mg/mL. O mesmo composto também gerou arrasto do ciclo celular em G0/G1, induziu a apoptose e alterou a expressão de genes associados a esses eventos (WANG *et al*, 2014).

Muitos estudos *in vivo* são realizados utilizando polissacarídeos, e dentro desses, diversas atividades modulatórias diferentes são reportadas. Ao tratar camundongos C57BL/6, previamente inoculados com células da linhagem B16-F10, com um polissacarídeo extraído da polpa de framboesa, Yang e colaboradores detectaram, entre outros efeitos, redução do tamanho tumoral, diminuição da perda de peso dos animais frente à patologia, proliferação de células do sistema imune e efeito adjuvante ao quimioterápico docetaxel, reduzindo danos nos fígados e rins. Além dos efeitos evidenciados, não foi detectado, pelo método de MTT, diminuição da viabilidade celular das linhagens HT-29, MGC-803, HeLa, Bel-7420, L02 e B16-F10, com as concentrações utilizadas variando de 1 a 256ug/mL (YANG *et al*, 2015).

Os polissacarídeos empregados neste trabalho, uma galactana extraída de *Codium isthmocladum* e uma heteroramnana obtida de *Gayralia brasiliensis*, provêm de algas verdes marinhas. Tem-se, portanto, especial interesse nos compostos advindos desses organismos marinhos, bem como em suas possíveis propriedades medicinais/farmacológicas.

O ambiente marinho apresenta grande complexidade de fatores ambientais, permitindo o aparecimento de diferentes níveis organizacionais de biota. A competição por espaços em um recife de coral, por exemplo, passa pela melhor adaptação às peculiaridades do entorno, além do desenvolvimento de defesas, os chamados metabólitos secundários. Desde a década de 60 estes são denominados “As drogas do mar”, e seu estudo já resultou no descobrimento de várias propriedades medicinais (SCHEUER, 1990).

Vários metabólitos secundários de organismos marinhos já tiveram propriedades

antitumorais identificadas. Entre outras funções, esses compostos demonstraram a capacidade de: inibir passos da cascata de sinalização para crescimento e proliferação celular; promover o arrasto do ciclo celular através da inibição de proteínas como ciclinas e Cdks; induzir células tumorais a apoptose; comprometer a angiogênese tumoral; diminuir a capacidade migratória e invasiva de células cancerígenas; e gerar citotoxicidade em células com alta taxa de proliferação (SCHUMACHER *et al.*, 2011).

Entre as drogas com atividades antitumorais obtidas de organismos marinhos já descritas, três delas já são usadas em ensaios clínicos: a trabectedina, a citarabina e a eribulina (SCHUMACHER *et al.*, 2011).

A trabectedina foi inicialmente identificada como possuindo capacidade antiproliferativa e imunomodulatória em 1969, então extraída da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, sendo hoje produzida sinteticamente (CUEVAS; FRANCESCH, 2009). Em 2007 esse composto recebeu sua primeira autorização para uso clínico, sendo indicado para o tratamento de sarcomas de tecidos moles não responsivos a quimioterápicos comumente usados, podendo ser também usado em conjunto com outras drogas. Sua principal forma de ação esta relacionada a indução de erros no processo de reparo do DNA em células com alto número de danos na dupla hélice, induzindo arrasto do ciclo e morte celular (DINCALCI; GALMARINI, 2010).

Após mais de 30 anos da descoberta das propriedades antitumorais da halicondrina β , extraída do porífero *Halichondria okadai*, o análogo mesilato de eribulina foi sintetizado, sendo em 2010 aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer de mama metastático. Esta droga possui atividade inibitória da dinâmica de polimerização dos microtúbulos, ligando-se à extremidade em crescimento e sequestrando tubulinas livres, impedindo a polimerização deste filamento protéico do citoesqueleto, ocasionando o arrasto do ciclo celular na fase G2/M (SHETTY; GUPTA, 2014; JACKSON; HENDERSON; PHILLIPS, 2009; DOHERTY; MORRIS, 2015).

A utilização de polissacarídeos extraídos de algas é há muito conhecida. Produtos como agar, algininas e carrageninas são amplamente usados na indústria alimentícia (RENN, 1997).

Diversos polissacarídeos sulfatados (como o utilizado neste trabalho) e não sulfatados extraídos de algas têm apresentado propriedades medicinais. Entre essas,

são descritas na literatura atividades anticoagulantes, antivirais, antioxidantes e antitumorais (WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011).

As atividades antitumorais de polissacarídeos extraídos de algas são variadas. Estudos mostram que esses compostos podem induzir a apoptose celular através da fosforilação e conseqüente ativação de ERK 1/2 e c-jun N-terminal quinases (JNK), além de liberação do citocromo C no ambiente citosólico, em linhagens celulares de leucemia (JIN *et al*, 2010). Park e colaboradores mostram a atividade antiproliferativa de um desses polissacarídeos na linhagem AGS de câncer gástrico humano, sem prejudicar o crescimento de fibroblastos pulmonares humanos normais, além de indução de apoptose das células cancerígenas através do decréscimo de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, e ativação de pró-caspases 3, 8 e 9 (PARK *et al*, 2010). Outro estudo demonstra atividades imunomodulatórias, gerando aumento de proliferação de células do sistema imune e maior atividade de macrófagos, em um modelo *in vivo* de carcinoma hepatocelular (FAN *et al*, 2012). Uma fucoxantina extraída da alga *Ishige okamurae* resultou em citotoxicidade celular na linhagem B16-F10, detectada pelo método de MTT, além de inibição da progressão do ciclo celular na fase G0/G1 através de diminuição da expressão de ciclinas D1 e D2, conseqüentemente diminuindo a atividade da CDK4 (KIM *et al*, 2013).

Muitos registros na literatura demonstram a modulação da proliferação celular *in vitro* e *in vivo* por polissacarídeos extraídos de algas. Em ensaios *in vitro* empregando dois compostos sulfatados extraídos das algas *Sargassum henslowianum* C. Agardh e *Fucus vesiculosus*, Ale e colaboradores evidenciaram uma diminuição concentração dependente na proliferação celular da linhagem B16-F10 tratada com esses compostos, além de indução da apoptose, provavelmente associada ao aumento da atividade da caspase 3, o qual também foi verificado no estudo (ALE *et al*, 2011). Em estudo *in vivo* utilizando camundongos inoculados com células da linhagem S180, o tratamento de 10 dias com um polissacarídeo extraído da alga *Enteromorpha intestinalis* resultou em diminuição de até 70,59% da massa tumoral em relação ao controle (JIAO *et al*, 2009).

Diversos trabalhos relatam as propriedades antitumorais de polissacarídeos extraídos especificamente de algas verdes, como por exemplo diminuição de

viabilidade celular, condensação de cromatina e fragmentação de DNA (características de apoptose), aumento de fosforilação de caspase-3 (proteína pró- apoptótica), e aumento de expressão do receptor extrínseco pró-apoptótico DR5 na linhagem celular HL-60 (GANESAN *et al*, 2011); atividade citotóxica nas linhagens celulares AGS (câncer gástrico humano) e HeLa, e atividade imunomoduladora resultando em aumento de proliferação de macrófagos murinos (linhagem celular Raw 264.7) e aumento de produção de citocinas (KARNJANAPRATUM e YOU, 2011); diminuição da atividade da fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K, o qual é relacionado ao crescimento e sobrevivência celular tumoral através da ativação de Akt, uma serina/treonina tirosina quinase, a qual fosforila outras moléculas relacionadas a esses processos) através de inibição da fosforilação do receptor de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R), consequentemente diminuindo a atividade do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-1), em células da linhagem AGS de câncer gástrico (KWON e NAM, 2007).

Dados recentes de nosso laboratório de Biscaia *et al* 2012 mostram que polissacarídeos extraídos de fungos impostos a linhagem de melanoma murino, B16-F10, geraram modificações morfológicas e ultraestruturais nesta linhagem, gerando maior espraçamento, inibição de contato e emissão de expansões membranares, além de ocasionar inibição da progressão do ciclo celular e diminuição da capacidade invasiva. Dessa forma as evidências científicas do potencial promissor como possíveis agentes farmacológicos de polissacarídeos em modelos tumorais embasam e entusiasmam o desenvolvimento do presente trabalho.

1.5.1 Polissacarídeos em estudo

O polissacarídeo obtido da alga verde *Codium isthmocladum* foi extraído, caracterizado e gentilmente cedido pelo grupo científico do Professor Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

O gênero *Codium* compreende um grupo de algas verdes cosmopolita, com mais de 125 espécies descritas, sendo oito destas presentes na costa brasileira. A espécie *Codium isthmocladum* foi primeiramente descrita em 1905, e tem distribuição notificada

em toda a extensão do litoral do Brasil (VICKERS, A., 1905. Disponível em: < http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=12248 > acessado em: 14 de abril de 2015; OLIVEIRA-CARVALHO, 2010).

As espécimes de *Codium isthmocladum* foram coletadas no litoral de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, e o polissacarídeo obtido desta alga e empregado neste estudo é uma galactana sulfatada, com monômeros de β -D-galactopiranosil 3 ligado 4 sulfatado, de característica hidrofílica (FARIAS, 2008).

Em um estudo avaliando possíveis atividades modulatórias em processos celulares empregando 11 polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas tropicais, sendo um desses a galactana extraída de *Codium isthmocladum*, Costa e colaboradores (2009) descrevem que este composto apresentou efeitos anticoagulantes em ensaio de Tempo de Ativação Parcial de Tromboplastina (APTT), e atividade antiproliferativa sobre a linhagem celular HeLa, atingindo 42.1% de inibição do crescimento celular no tratamento de 2.0 mg/mL (COSTA, 2009).

O polissacarídeo obtido da alga verde *Gayralia brasiliensis* foi extraído, caracterizado e gentilmente cedido pelo grupo científico da Professora Dr.^a Maria Eugenia Duarte Nosedá, do Departamento de Bioquímica da UFPR.

A espécie *Gayralia brasiliensis*, pertencente ao filo das Chlorophytas, classe Ulvophyceae, foi recentemente catalogada por Pellizzari e colaboradores (2013), tendo sido coletada em Paranaguá e Gauratuba, no litoral do Estado do Paraná, Brasil (PELLIZZARI *et al*, 2013).

A caracterização dos polissacarídeos obtidos da alga *Gayralia brasiliensis* foi conduzida por Berté (2013), resultando em frações com alta quantidade de grupamentos sulfato e ácidos urônicos. A fração utilizada nesta dissertação corresponde a uma heteroramnana, a qual apresenta predominantemente monossacarídeos de ramnana (64%), xilose (14.7%), glucose (14.5%) e galactose (6.7%). Esta fração não diminuiu a viabilidade celular da linhagem de glioma humano U87MG nas concentrações de 25, 100 e 500 μ g/mL em 24h de tratamento, analisado pelo método de MTT, porém as mesmas concentrações em 48h de exposição diminuíram a viabilidade de forma estatisticamente significativa em relação ao controle. Ensaio de coagulação e atividade anti-viral também foram realizados com essa fração,

utilizando concentrações de 20 a 200µg/mL, resultando em modulação anti-coagulante e diminuição da carga viral (BERTÉ, 2013).

1.6 JUSTIFICATIVA

Alto consumo de gorduras e açúcar, exposição à luz UV, predisposição genética, consumo de álcool e tabaco, sedentarismo, radiação, agentes virais: esses e outros tantos fatores podem culminar no desenvolvimento da segunda patologia mais letal do mundo: o câncer. Relatos dessa doença datam de tempos antigos, quando sua causa era desconhecida e o tratamento inexistente. Centenas de anos se passaram e grandes descobertas foram feitas, permitindo traçar a origem tumoral a uma única célula, a qual acumula danos em seu DNA, foge dos controles celulares e do comportamento tecidual normal, dividindo-se continuamente e dando origem a um tumor, podendo até mesmo invadir outros tecidos e órgãos (VAIOPOULOS *et al*, 2014).

O tratamento eficaz para o câncer continua inexistente, porém, a remoção cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia e atualmente imunomoduladores, inibidores moleculares específicos e terapias hormonais, permitiram grandes avanços no combate à doença (URRUTICOECHEA *et al*, 2010).

Mesmo com o desenvolvimento de novos tratamentos e o aprimoramento dos já existentes, mais de 8 milhões de pessoas foram a óbito em decorrência do câncer no ano de 2012 (IARC, 2014).

A capacidade de invadir outros tecidos e órgãos, processo denominado de metástase, é o principal fenômeno relacionado a complicações no tratamento do câncer, e algumas formas dessa patologia, como o melanoma, apresentam alta taxa metastática. A remoção cirúrgica muitas vezes deixa de ser uma opção, e mesmo quando realizada, células do tumor podem persistir no local da excisão e promover o regresso da doença. O uso de terapias sistêmicas, como quimioterápicos, apresenta suas limitações, visto que há o desenvolvimento de resistência a esses compostos, além de sua elevada citotoxicidade devido a falta de seletividade entre tecido normal e tecido cancerígeno, gerando diversos efeitos colaterais (GALMARINA *et al*, 2012; CALEY; JONES, 2012).

O câncer de pele, dividido em não melanoma e melanoma, é o tumor mais

incidente em seres humanos, sendo uma das poucas formas dessa doença que continuam a ter crescimento em sua incidência ao redor do mundo (DEMERS *et al*, 2005; INCA, 2014).

O melanoma é a forma menos incidente de câncer de pele, representando apenas 4% dos diagnósticos desse tipo de patologia no Brasil, porém devido a sua grande capacidade metastática, é a de maior letalidade. Quando em estágio avançado, o tempo médio de vida do paciente é menor do que um ano, sendo que o tratamento passa a ser apenas paliativo (INCA, 2014; DUNKI-JACOBS *et al*, 2013).

Tendo em vista o grande impacto humano causado pelo câncer e a necessidade do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menores efeitos colaterais, moléculas bioativas extraídas de fontes naturais são de grande interesse. Entre esses compostos, destacam-se os polissacarídeos, que apresentam extenso relato na literatura de propriedades farmacológicas, entre elas atividade antitumoral através de imunomodulação, indução a apoptose, diminuição da proliferação, arrasto do ciclo celular, diminuição da capacidade migratória e invasiva, entre outros (ZONG, CAO e WANG, 2012).

Com base no interesse da descrição de biomoléculas com propriedades farmacológicas antitumorais, o objetivo deste trabalho foi buscar possíveis efeitos modulatórios de dois polissacarídeos extraídos de algas verdes em algumas mecânicas celulares, tendo como modelo a linhagem B16-F10, de melanoma murino, e a linhagem RAW 264.7, de macrófago murino.

2. OBJETIVO

Devido às dificuldades no tratamento do câncer e ao grande potencial farmacológico de polissacarídeos obtidos de fontes naturais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis atividades biológicas de uma galactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum* e de uma heteroramnana sulfatada extraída da alga *Gayralia brasiliensis* na linhagem celular B16-F10, além de realizar um estudo inicial da atividade desses compostos na linhagem celular RAW 264.7.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

Empregamos duas linhagens celulares para o desenvolvimento deste trabalho:

- A linhagem B16-F10 de melanoma murino, advinda do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25cm² (Sarstedt) ou em placas de 6 poços (Sarstedt), com meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Life Technologies) em 0,85% de solução salina. Estas foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera húmida.
- A linhagem de macrófagos RAW 264.7 de macrófagos murinos, advinda do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRF. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25cm² (Sarstedt) ou placas de 6 poços (Sarstedt), com meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina (Life Technologies) em 0,85% de solução salina. Mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, em atmosfera húmida.

Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram desaderidas dos plásticos de cultivo celular através da ação enzimática da tripsina (Gibco) por 5 minutos ou a 2mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético; Gibco), ou removidas mecanicamente com o auxílio de *scraper* (Sarstedt); coletadas em tubos de 15 mL (Sarstedt), centrifugadas a 1800rpm por 3 minutos, ressuspensas em meio DMEM (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. Os tratamentos com os polissacarídeos foram adicionados 24 horas após o plaqueamento das células ou, quando necessário, após 24h de carenciamento de soro fetal bovino.

3.2 Diluição dos polissacarídeos

As concentrações dos compostos utilizadas neste estudo para a realização dos experimentos foram de 1 µg/mL, 10µg/mL, 100µg/mL e 1000 µg/mL, com períodos de exposição de 24, 48 e 72h. Após os resultados iniciais obtidos com os ensaios de MTT, VN e Cristal Violeta, as concentrações de 10 e 100µg/mL de ambos os compostos, com período de exposição de 72h, foram selecionadas para os demais estudos.

A diluição dos polissacarídeos empregados foi em meio DMEM (Gibco) sem soro fetal bovino. As soluções são vortexadas por 5 minutos, sonicadas (TestLab) por 1h a temperatura ambiente e então filtradas em filtros de 0.22µm (Millipore), sendo que o processo de homogeneização destas é repetido antes de cada experimento realizado.

O grupo controle de todos os experimentos passou pelos mesmos procedimentos dos grupos tratados, sendo que o mesmo volume de DMEM sem soro fetal bovino adicionado nestes para diluir os compostos foi adicionado no grupo controle.

O polissacarídeo extraído da alga *Codium isthmocladum* passa a ser denominado aqui como CI, e o polissacarídeo extraído da alga *Gayralia brasiliensis* passa a ser denominado GB.

3.3 Viabilidade Celular – Vermelho Neutro

O método de Vermelho Neutro foi descrito pela primeira vez por Borenfreund e Puerner (1984), com a intenção de ser uma forma simples e barata de determinar a citotoxicidade de compostos, sendo ainda hoje um experimento amplamente utilizado para essa finalidade. Em células viáveis, a manutenção de gradientes de pH, através da síntese de ATP, gera um ambiente levemente mais ácido no interior dos lisossomos, o que permite que o corante, uma vez internalizado, sofra alterações de carga e fique retido na organela (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008). Através de uma solução de eluição é possível realizar a leitura de absorbância das amostras relacionando maiores taxas de viabilidade a maiores valores de absorbâncias.

Após atingir de 70% a 80% da confluência celular da garrafa de cultura de 25cm² (Sarstedt), as células da linhagem B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt). Plaqueou-se 500 células por poço. Após 24h, estas foram tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por 24h, 48h e 72h.

Duas horas antes do término do período de exposição, as células foram incubadas com 15µL de uma solução mãe de vermelho neutro (Sigma) de 1100µg/mL

solubilizado em PBS, sendo diluído então em 135µL do meio de cultivo, obtendo assim uma concentração final de 100µg/mL de vermelho neutro. Como controle negativo empregou-se poços contendo saponina 0.01% (Sigma) diluída em PBS, adicionado uma hora antes da adição do corante. Após empregou-se a solução de eluição (Etanol / Ácido Acético Glacial; 50%/10% em água ultrapura) e homogeneização do conteúdo do poço. A absorbância foi lida em leitor de microplacas em 540nm (Biotek Epoch).

3.4 Citotoxicidade Celular – MTT

O método do MTT foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSSMAN *et al.*(1983), REILLY *et al.*(1998), e FOTAKIS e TIMBRELL (2006). No ensaio de MTT, a presença de citotoxicidade celular é avaliada através da atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa, o qual fica retido no interior da célula. Após a solubilização com dimetil-sulfóxido, obtém-se uma solução cuja absorbância é proporcional a quantidade de cristais formados.

Após atingir de 70% a 80% da confluência da garrafa de cultura de 25cm² (Sarstedt), as células da linhagem B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt). Empregou-se 500 células por poço. Após 24h, estas foram tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por 24h, 48h e 72h. Uma solução de triton 0.01% (Sigma) diluída em PBS foi utilizada como controle negativo, a qual foi adicionada nos poços correspondentes 1h antes da adição do corante.

Três horas antes do término do período de exposição, as células foram incubadas com 15µL de uma solução mãe de MTT a 5mg/mL (Thyazoly Blue Tetrazolium Bromide - Sigma), em 135µL de meio de cultura.

O conteúdo dos poços foi então removido, e os cristais de formazan formados no interior das células foram eluídos em 100µL de DMSO (Merck), procedendo para a leitura de absorbância em leitor de microplacas em 540nm (Biotek Epoch).

3.5 Proliferação Celular – Cristal Violeta

Este ensaio foi realizado conforme GILLIES *et al* (1986) com modificações.

O experimento de proliferação celular através do método de cristal violeta permite obter dados quantitativos em relação à densidade celular presente em monocamadas de células cultivadas. O corante liga-se ao núcleo das células, e após a eluição e leitura de absorbância do mesmo é possível estabelecer uma relação direta com a absorbância e o número de células presentes.

Para este experimento, após atingir de 70% a 80% da confluência da garrafa de cultura de 25cm² (Sarstedt), as células B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas 500 células por poço em placas de 96 poços (Sarstedt). Após 24h, estas foram tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por 24h, 48h e 72h.

Após o período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído 2% (E.M.S.) por 30 minutos, lavadas 2x com PBS, coradas com 100µL da solução de cristal violeta 0,2% (Sigma) em etanol (Merck) 5%, durante 5 minutos, e então lavadas 10x com PBS.

O corante foi então eluído com 100µL da solução de ácido acético (Dinâmica) 33% em água ultra pura (15 minutos), procedendo-se então para a leitura da absorbância em leitora de microplacas em 570nm (Biotek Epoch).

3.6 Potencial de Membrana Mitocondrial – Rhodamina 123

O emprego da Rhodamina 123 para avaliação do potencial de membrana mitocondrial em citometria de fluxo foi primeiro descrito por Hernandez-yago *et al* (1988), e o procedimento aqui realizado foi baseado no método descrito nesse artigo, com modificações.

A rhodamina 123 é um corante fluorescente catiônico lipofílico rapidamente captado por mitocôndrias com potencial de membrana em homeostase fisiológica, devido ao interior negativamente carregado dessas organelas e a afinidade a estruturas da matriz mitocondrial. A permanência desse corante no interior da mitocôndria depende da manutenção do gradiente de prótons ali presente, resultado do potencial de membrana mitocondrial (MMP), permitindo que alterações deste parâmetro (resultado de um composto citotóxico induzindo o processo apoptótico pela via intrínseca, por exemplo), possam ser detectadas devido à modificação da fluorescência da amostra.

Após atingir de 70% a 80% da confluência da garrafa de cultura de 25cm² (Sarstedt), as células da linhagem B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas em placas de 6 poços (Sarstedt), com 18000 células por poço, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h.

Após o período de tratamento, as células foram desaderidas mecanicamente com auxílio de *scrapers*, transferidas para tubos de citômetro previamente identificados, lavadas duas vezes com PBS a 37° C, e então incubadas por 15 minutos com uma solução de Rhodamina 123 (Sigma) diluída em PBS em ambiente escuro. Após, as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas em 400µL dessa solução salina. As amostras foram então lidas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando o software CellQuest (BD Biosciences) no canal de laser FL2, com 10000 eventos contabilizados. A análise dos dados foi feita através do software Flowing Software 2.

3.7 Ciclo Celular – Kit PI/RNase

A análise dos estágios do ciclo celular foi realizada segundo kit comercial PI/RNase Staining Buffer, catálogo número 550825, BD Pharmingen.

O iodeto de propídio (PI) é um corante fluorescente intercalante de nucleotídeos (tanto os presentes em dupla fita como em fita simples). Com a incubação das amostras utilizando o Kit PI/RNase, a enzima presente degrada as fitas simples (RNA), logo o

material intercalado pelo iodeto de propídio corresponde unicamente ao conteúdo de DNA. Células em fases do ciclo G2 e M possuem o material genético duplicado, sendo que nas fases G0 e G1 este material não está duplicado. Células em S tem um conteúdo de DNA que se encontra entre esses extremos.

As células B16-F10 ($4,5 \times 10^4$ células) foram plaqueadas em garrafas de cultivo de 25cm^2 (Sarstedt) com DMEM (Gibco) sem soro fetal bovino, permitindo a sincronização do ciclo celular (G0), mantidas em incubadora de CO_2 *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com os polissacarídeos CI e GB nas concentrações de 10 e $100\mu\text{g/mL}$, por 72h.

Após o período de tratamento, as células foram desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco) e transferidas para microtubos de 2mL. Posteriormente foram fixadas em paraformaldeído 1% (E.M.S.) por 30 minutos. Após a fixação, estas foram lavadas 2x e ressuspensas em álcool 70% (Dinâmica), e mantidas a -20°C por 72h.

Após estas foram contadas em Neubauer, e $2 \cdot 10^5$ células foram mantidas em tubos de citometria, lavadas 2x com PBS e ressuspensas por 15 minutos em $500\mu\text{L}$ da solução tampão de PI/RNase. Novamente lavadas com PBS, e então analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Empregou-se o software CellQuest (BD Biosciences) no canal de laser FL2, 10000 eventos foram contabilizados. A análise dos dados foi feita através do software Flowjo V10.

3.8 Análise Morfológica e Ultraestrutural – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de verificar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pela exposição da linhagem B16-F10 aos polissacarídeos CI e GB, o processamento de amostras para a visualização em microscopia eletrônica de varredura foi empregada.

Para este experimento, após atingir de 70% a 80% da confluência da garrafa de cultura de 25cm^2 (Sarstedt), as células B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C , desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, plaqueadas 1200 células em placas de 24 poços (Sarstedt), sobre lamínulas circulares (Kasvi), mantidas em incubadora de CO_2 *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com os polissacarídeos CI e GB na concentração de $100\mu\text{g/mL}$, por 72h.

A seguir, estas foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4,0%, CaCl_2 1mM em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 1 hora. Após foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão Cacodilato de sódio 0,1M – pH 7,4) por 1 hora. Lavadas em tampão cacodilato 0,1M, desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%; (Dinâmica), por um período de 10 minutos em cada concentração. Submetidas ao ponto crítico no aparelho (CPD 010 (Critical Point Dryer) 030 - Balzers), metalizadas com ouro no aparelho (SCD 030 – Balzers), e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE). Imagens das amostras foram capturadas nos aumentos de 500, 2000 e 4000 vezes.

3.9 Ensaio de formação de colônias

Esse experimento foi realizado utilizando o kit Algimatrix Sistema de Cultura 3D (Gibco). Esse sistema consiste em uma placa de 24 poços preenchidos com “esponjas” de alginato, que simulam uma matriz.

O ensaio de colônias consiste em analisar a capacidade de uma única célula, após radiação ionizante ou tratamentos biológicos e/ou químicos, proliferar, em superfícies simples, como placas de cultura, ou em meios complexos, como ágar ou formulações que mimetizam, em maior ou menor escala, uma matriz extracelular. A primeira descrição do experimento foi feita por Puck e Marcus (1956), utilizando a linhagem HeLa, de adenocarcinoma humano.

Para este experimento, após atingir de 70% a 80% da confluência da garrafa de cultura de 25cm² (Sarstedt), as células B16-F10 foram lavadas com PBS a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer e então foram plaqueadas 15000 células em placas de 6 poços (Sarstedt), mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com os polissacarídeos CI ou GB nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h. Após esse período, as células foram novamente desaderidas e contadas, e então 2500 células de cada tratamento foram colocadas em microtubos de centrifuga (Sarstedt) em uma solução de 500µL, constituída de 450µL de DMEM com 10% de soro fetal bovino, e

50µL de solução de *buffer* (fornecida junto com o kit Algimatrix; Firmig Buffer, Gibco). Esse conteúdo foi então colocado em poços da placa de 24 poços fornecida com o kit Algimatrix. A placa foi então centrifugada por 4 minutos a 100 G, para que o conteúdo penetrasse na matriz de alginato presente nos poços, procedendo-se então para incubação em incubadora de CO₂ por 6 dias. O meio dos poços foi substituído a cada três dias.

Após o período de incubação, o meio dos poços foi removido sem perturbar a matriz de alginato. Estas foram lavadas com DMEM sem soro fetal bovino, para então serem fixadas com paraformaldeído 1%, diluído em DMEM sem soro, por 24h. Foram novamente lavadas com DMEM sem soro, e coradas com cristal violeta 0,2% (Sigma) em etanol (Merck) 5%, por 30 minutos. Após esse período, os poços foram lavados com DMEM sem soro, e as “esponjas” de alginato foram fotografadas em lupa microscópica no aumento de 2x. Utilizando o software ImageJ Fiji, as colônias formadas foram contadas, sendo que apenas as que possuíam mais de 0.9mm foram contabilizadas.

3.10 Dinâmica de Migração Celular

Para avaliar a dinâmica de migração celular, empregou-se o método de *Scratch* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Este método é baseado na criação de um risco (*scratch*) em uma monocamada de células com características aderentes. A partir do momento que se perca a monocamada através do risco, essas irão se mover a fim de fechar a abertura feita e reestabelecer as interações célula-célula.

Duas abordagens experimentais diferentes foram adotadas para a avaliação da capacidade migratória da linhagem B16-F10 após o tratamento com os polissacarídeos:

- 1º ensaio de migração. Em uma placa de 96 poços adaptada a equipamentos de *high content screening* (Corning), 500 células da linhagem B16-F10 foram plaqueadas por poço, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight*. Após estas foram tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h. Após o período de tratamento, o meio dos poços foi removido, sendo então adicionado 100µl de mitomicina C (para bloquear a

proliferação celular) na concentração de 10µg/mL diluída em DMEM sem soro fetal bovino, por 2h em incubadora de CO₂. Ao final das 2h, com o auxílio do equipamento Incucyte Zoom Cell Migration Kit (ESSEN Bioscience), foram realizados riscos homogêneos no centro dos poços. Posteriormente lavou-se duas vezes com DMEM sem soro fetal bovino, o qual foi mantido ao final da segunda lavagem. Por aproximadamente 15h, a placa foi mantida no equipamento Incucyte Zoom System (ESSEN Bioscience). Imagens de todos os poços foram capturadas a cada 1h, em aumento de 100x. As fotos foram analisadas com o auxílio do programa T scratch, permitindo determinar a porcentagem de fechamento da área do risco ao longo do tempo.

- 2º ensaio de migração. Em uma microplaca de quatro poços com centro de fundo de vidro (Greiner), 10.000 células da linhagem celular B16-F10 foram plaqueadas por poço, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) na concentração de 100µg/mL, por 72h. Após o período de tratamento, o meio dos poços foi removido, sendo então adicionado 300µl de mitomicina C (para bloquear a proliferação celular) na concentração de 20µg/mL diluída em DMEM sem soro fetal bovino, por 1h em incubadora de CO₂. Ao final de 1h, com o auxílio de uma ponteira de plástico de 10µL, um risco foi feito em cada um dos poços; estes foram então lavados duas vezes com DMEM sem soro fetal bovino, o qual foi mantido ao final da segunda lavagem. Pelas próximas 15h, a placa foi mantida em uma câmara húmida de CO₂ acoplada ao microscópio de varredura a laser confocal A1R MP (Nikon). Registros fotográficos foram obtidos de todos os poços a cada 15 minutos, no aumento de 200x. As imagens foram analisadas com o auxílio do programa T scratch, permitindo determinar a porcentagem de fechamento do risco ao longo do tempo.

Nas duas abordagens, as imagens foram analisadas utilizando o software *T scratch*, e as análises estatísticas foram feitas com o software *GraphPad Prism*.

3.11 Imunomarcações em citometria de fluxo

Diferentes biomoléculas associadas aos eventos de tumorigenicidade foram marcadas e analisadas em citometria de fluxo. Para essas marcações, células da linhagem celular B16-F10 foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm² ou em placas de 6 poços, mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com os polissacarídeos CI ou GB nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h. Posteriormente foram desaderidas com o auxílio de *scrapers*, passadas para tubos de citômetro previamente identificados e submetidas ao processamento necessário para a marcação da molécula analisada. Para a marcação do receptor CD54 empregou-se a linhagem RAW 264.7 (macrófago murino). Um total de 42.000 células foram plaqueadas por poço, em placas de 24 poços (Sarstedt), mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com os polissacarídeos CI ou GB nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h. Em todos os procedimentos realizados, a fixação das células foi realizada com paraformaldeído 2% (EMS), os radicais aldeídos foram bloqueados com glicina 0.1M (VETEC) em PBS, permeabilizadas com saponina 0.01% (Sigma), e sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% (Sigma).

Os anticorpos primários utilizados na linhagem B16-F10 foram: IgG anti-NG2 (SC-30921), IgG anti-N-caderina (SC-31030), IgG anti-CD44 (BD-550538). Como anticorpos secundários empregamos IgG goat anti-rat conjugado com FITC (Jackson 112-095-003), IgG anti-goat conjugado com Aluxa Fluor 488 (Invitrogen A11078). O anticorpo IgG anti-CD54 conjugado com PE (BD 553253) foi utilizado na marcação dos macrófagos. Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando o software CellQuest (BD Biosciences) no canal de laser adequado ao secundário utilizado, com 10000 eventos para cada amostra. A análise dos dados foi feita através do software Flowing Software 2.

3.12 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) – Macrófagos (RAW)

Para este experimento, foi empregada a sonda fluorescente DCFH-DA (Sigma). Esta é um fluoróforo hidrofóbico não fluorescente, que permite a detecção do status oxidativo geral da célula. No meio intracelular, a sonda é hidrolisada por esterases, gerando a molécula DCFH, a qual pode ser oxidada e formar o componente fluorescente 2',7' dichlorofluorescein (DCF), permitindo sua detecção e análise da fluorescência gerada.

A linhagem celular RAW 264.7 foi empregada neste ensaio, sendo que 42.000 células foram plaqueadas por poço, em placas de 24 poços (Sarstedt), mantidas em incubadora de CO₂ *overnight* e após, tratadas ou não (grupo controle) com a galactana (extraída de *Codium isthmocladum*) ou a heteroramnana (extraída de *Gayralia brasiliensis*) nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h.

Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS livre de lipopolissacarídeos de bactérias (LPS free) a 37°C, e então a sonda DCFH-DA – diluída em PBS em uma concentração final de 1 µM – foi adicionada. A placa foi incubada por 30 minutos em incubadora de CO₂, e 5 minutos antes do término da incubação, foi adicionado H₂O₂ nos poços de controle positivo. Em banho de gelo, as células foram desaderidas com auxílio de *scrapers* (Sarstedt) e transferidas para tubos de citômetro previamente identificados, lavadas com PBS e imediatamente analisadas em citometria de fluxo, no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Empregou-se o software CellQuest (BD Biosciences) no canal de laser FL1, com 10000 eventos contabilizados. A análise dos dados foi realizada através do software Flowing Software 2.

3.13 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism V.6.01. Quando o N amostral foi grande o suficiente, o teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi empregado para verificar a normalidade ou não da distribuição dos dados. Em presença de normalidade, o teste T pareado foi empregado. Em ausência de normalidade ou em impossibilidade de realização do teste de normalidade, os dados foram admitidos como possuindo distribuição não normal, e o teste T não pareado (Mann Whitney) foi empregado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade e citotoxicidade celular – MTT e Vermelho Neutro

O investimento no desenvolvimento de uma nova droga comercial contra qualquer patologia é um processo milionário, demorado e sujeito a falhas ao longo do processo. Dentre os possíveis problemas enfrentados, destaca-se a citotoxicidade em modelos *in vivo*, sendo uma das causas do abandono de 20% dos estudos em fase pré-clínica e clínica de novos compostos no ano de 2000. Métodos *in vitro* que forneçam respostas possivelmente correlatas aos efeitos observados em modelos animais são de grande valia para diminuir o investimento em moléculas não promissoras devido a sua toxicidade (KOLA; LANDIS, 2004; MCKIM JUNIOR, 2010). O estudo de novos polissacarídeos enquadra-se na ciência básica, mas a análise de viabilidade e citotoxicidade celular são igualmente importantes, permitindo identificar ou descartar biomoléculas promissoras para novos ensaios.

Os ensaios de Vermelho Neutro e MTT são amplamente utilizados em estudos que analisam a viabilidade e a citotoxicidade de diferentes compostos em modelos *in vitro*. A sensibilidade desses métodos varia conforme a linhagem celular utilizada, pois observam diferentes parâmetros funcionais da célula, os quais podem variar de um modelo para outro. Para uma maior confiabilidade nos resultados, a literatura sugere que mais de um método deve ser empregado (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006; REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

Tendo isso em vista, os primeiros ensaios realizados com os polissacarídeos em estudo foram os de MTT e vermelho neutro, para averiguar possíveis efeitos citotóxicos na linhagem em estudo.

Podemos verificar que a galactana obtida da alga *Codium isthmocladum* diminui a capacidade de captação e retenção do corante nos lisossomos da célula de forma significativa, quando em comparação com o controle, apenas na concentração de 1000µg/mL em 48h de exposição, em aproximadamente 15%. Em 72h de exposição, há comprometimento estatisticamente significativo desta mecânica celular em todas as concentrações testadas, na ordem de 9.62%, 8.03%, 13.7% e 16.47% (1, 10, 100 e 1000µg/mL; Gráfico 1). No ensaio de MTT, o polissacarídeo apresentou diminuição significativa da atividade da succinato desidrogenase nas concentrações de 1, 100 e 1000ug/mL com 24h de exposição, de aproximadamente 5.63%, 9.19% e 9.03%

respectivamente (Gráfico 3).

A heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* apresentou efeito estatisticamente significativo no ensaio de vermelho neutro, quando comparado ao grupo controle, com diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 100µg/mL e 1000µg/mL em 48h de exposição, de aproximadamente 11% e 27% respectivamente; e em 72h de exposição, nas concentrações de 100µg/mL e 1000µg/mL, de 13% e 23% (Gráfico 2). No ensaio de MTT, em 24h de exposição, os tratamentos de 10, 100 e 1000µg/mL resultaram em redução da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial; assim como nas concentrações de 100 e 1000, com 48h de exposição; e em 72h, os tratamentos de 10, 100 e 1000µg/mL também diminuíram essa atividade de forma significativa, em 7%, 15% e 16%, respectivamente (Gráfico 4).

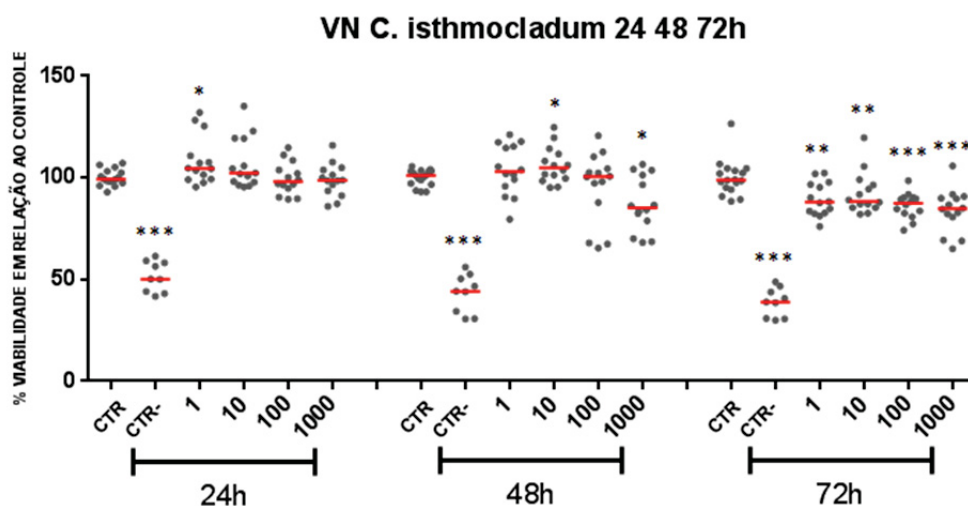


GRÁFICO 1 – Ensaio de Vermelho Neutro. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por tempo de exposição de 24,48 e 72h. Estes dados representam o resultado de quadruplicata biológica, com mínimo de triplicata técnica de cada uma das concentrações em cada ensaio. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste de Mann Whitney (significância de ***= p < 0,0001). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

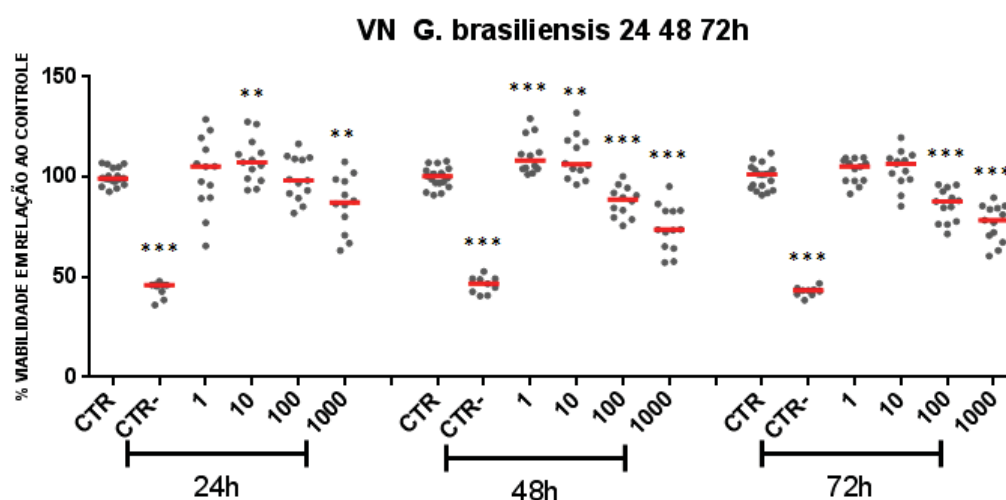


GRÁFICO 2 – Ensaio de Vermelho Neutro. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por tempo de exposição de 24,48 e 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, com mínimo de triplicata técnica de cada uma das concentrações em cada ensaio. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D’Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste de Mann Whitney (significância de ***= $p < 0,0001$). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

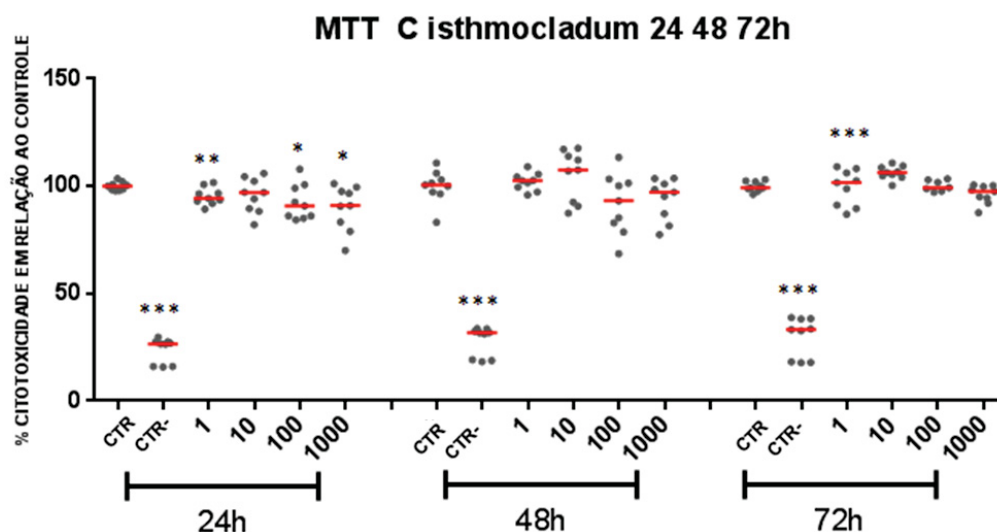


GRÁFICO 3 – Ensaio de MTT. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por tempo de exposição de 24,48 e 72h. Estes dados representam o resultado de três experimentos biológicos, com triplicata técnica de cada uma das concentrações. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D’Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste t (significância de ***= $p < 0,0001$).

0,0001). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

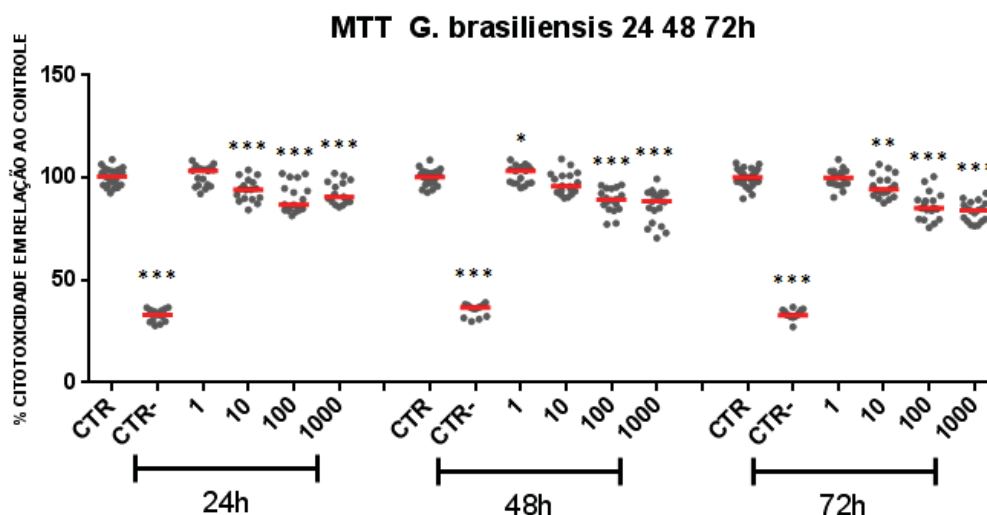


GRÁFICO 4 – Ensaio de MTT. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, por tempo de exposição de 24, 48 e 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, com mínimo de triplicata técnica de cada uma das concentrações em cada ensaio. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste de Mann Whitney (significância de ***= $p < 0,0001$). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

Ambos os compostos testados apresentaram certa diminuição da viabilidade celular ou geraram citotoxicidade celular medidas pelos métodos empregados. Há relatos na literatura de polissacarídeos com resultados semelhantes e que apresentam outras atividades farmacológicas. Kim e colaboradores (2013) utilizaram fucoxantina obtida de algas verdes em ensaios *in vitro* com a linhagem celular B16-F10. O polissacarídeo gerou citotoxicidade significativa em relação ao controle, de aproximadamente 87% na concentração de 200 µM, analisada pelo método de MTT e interpretada pelos autores como diminuição da proliferação celular; o composto também gerou apoptose celular (através de diminuição da proteína antiapoptótica Bcl-xL) e arrasto do ciclo celular (através de diminuição de ciclinas D1 e D2), ambos de forma concentração dependente. O polissacarídeo também foi testado em um ensaio *in vivo*. Para isso, tumores induzidos pela linhagem B16F-10 foram implantados em camundongos, e tratamentos com 300 µg do composto foram inoculados nos animais 24h e 2h antes da implantação do tumor, e então uma vez a cada cinco dias, durante

20 dias, resultando numa diminuição significativa do peso tumoral (KIM *et al*, 2013). Portanto, mesmo apresentando alta citotoxicidade para a linhagem cancerígena, a fucoxantina analisada apresentou modulação de diversas dinâmicas tumorais, sem comprometer o andamento dos ensaios em modelo animal.

Ainda em estudos feitos com a linhagem B16-F10, porém com um polissacarídeo extraído da poupa de framboesa, podemos verificar que a ausência de citotoxicidade em ensaios *in vitro* não representa ausência de atividade antitumoral, como mostrado por Yang e colaboradores. No estudo conduzido por esse autor, camundongos C57BL/6 tiveram tumores subcutâneos induzidos pela administração de células B16-F10, e foram então tratados com PBS (veículo), docetaxel (quimioterápico) e com o polissacarídeo (nas concentrações de 100,200 e 400 mg/kg) durante 14 dias. Apesar de não demonstrar exibir citotoxicidade nos ensaios *in vitro* com as linhagens tumorais HT-29, MGC-803, HeLa, Bel-7420, L02 e B16-F10, o composto em estudo diminuiu o tamanho e volume tumoral de forma dose dependente em 7.56%, 24.32% e 59.59% em relação ao grupo controle. Além disso, esse polissacarídeo apresentou atividade imunomoduladora, estimulando a proliferação de esplenócitos, bem como diminuiu danos renais e ao fígado dos animais tratados em conjunto com o quimioterápico (YANG *et al*, 2015).

Outra forma interessante de correlacionar os resultados obtidos seria identificar uma diminuição da viabilidade celular/indução à citotoxicidade de forma específica na linhagem B16-F10, mas ausência desses efeitos em outros modelos. Fan e colaboradores (2012) realizaram ensaios *in vivo* para avaliar as propriedades farmacológicas de um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gracilaria lemaneiformis*. Camundongos foram tratados durante quatro semanas com doses de 200 e 600mg/kg do composto, e no 14º dia sofreram a inoculação de um tumor da linhagem celular H22 em sua perna inferior direita. Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados para análise do tamanho do tumor, medição de interleucina 2 e quantidade de linfócitos no sangue periférico, além de remoção do fígado para ensaio de proliferação com os esplenócitos ali presentes, utilizando a técnica de MTT, e remoção do timo para medição da capacidade fagocítica dos macrófagos residentes, através do método de Vermelho Neutro. Os resultados mostram ausência de alterações

significativas na quantidade de linfócitos dos grupos tratados em relação ao grupo controle, porém o tratamento com o polissacarídeo resultou em aumento de interleucina 2, significativa redução do tamanho do tumor, e aumento significativo da proliferação de esplenócitos e da capacidade endocítica dos macrófagos (FAN *et al*, 2012). Estes resultados permitem verificar que o polissacarídeo em questão apresentou efeitos contra o processo tumoral, e não gerou citotoxicidade para as linhagens celulares observadas (esplenócitos e macrófagos), pelo contrário, promoveu proliferação e aumento da atividade biológica das mesmas. Dessa forma, uma das possíveis perspectivas futuras para os compostos aqui estudados seria a sua exposição em outras linhagens celulares, como as relacionadas ao sistema imune (macrófagos e leucócitos, por exemplo), a fim de verificar a especificidade ou não dos efeitos encontrados nos ensaios de MTT e vermelho neutro.

4.2 Proliferação Celular – Cristal Violeta

Como anteriormente citado, a análise dos efeitos citotóxicos de um composto deve ser feita por mais de um método, visando não superestimar ou subestimar os mesmos. A fim de verificar outro parâmetro que pudesse inviabilizar o uso dos polissacarídeos em estudo, e também para tentar identificar uma atividade moduladora dos mesmos, foi realizado o ensaio de proliferação celular através do emprego do corante cristal violeta, originalmente descrito como uma forma de determinar o número de células em uma monocamada (GILLIES *et al*, 1986).

O Gráfico 5 apresenta o resultado da exposição da linhagem celular B16-F10 ao polissacarídeo galactana extraído da alga *Codium isthmocladum*. A concentração de 1000µg/mL, em 24h de exposição, e todas as concentrações em 48h de tratamento resultaram em diminuição estatisticamente significativa da proliferação celular. O polissacarídeo heteroramnana extraído da alga *Gairalya brasiliensis* gerou queda na proliferação celular da linhagem B16-F10 no período de exposição de 48h, em todas as concentrações testadas (1, 10, 100 e 1000ug/mL), como evidenciado pelo Gráfico 6.

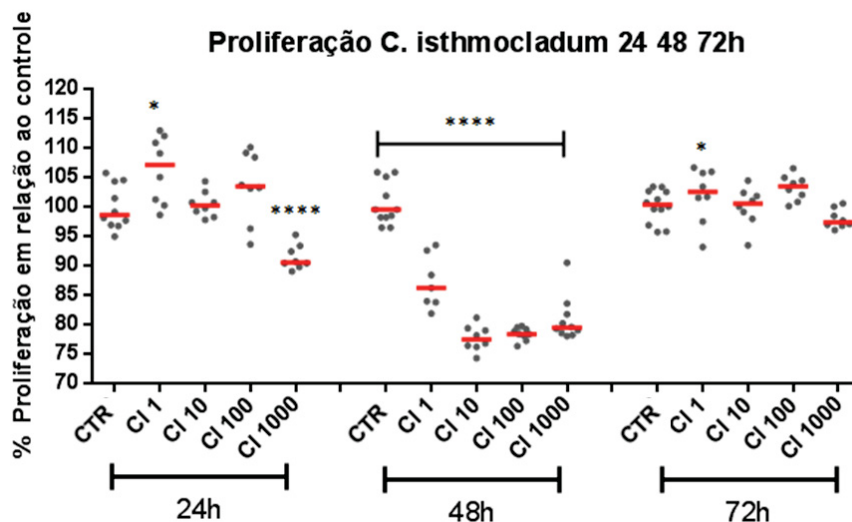


GRÁFICO 5 – Ensaio de Proliferação Celular. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por tempo de exposição de 24,48 e 72h. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com mínimo de triplicata técnica de cada uma das concentrações em cada ensaio. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D’Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste de Mann Whitney (significância de ***= $p < 0,0001$). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

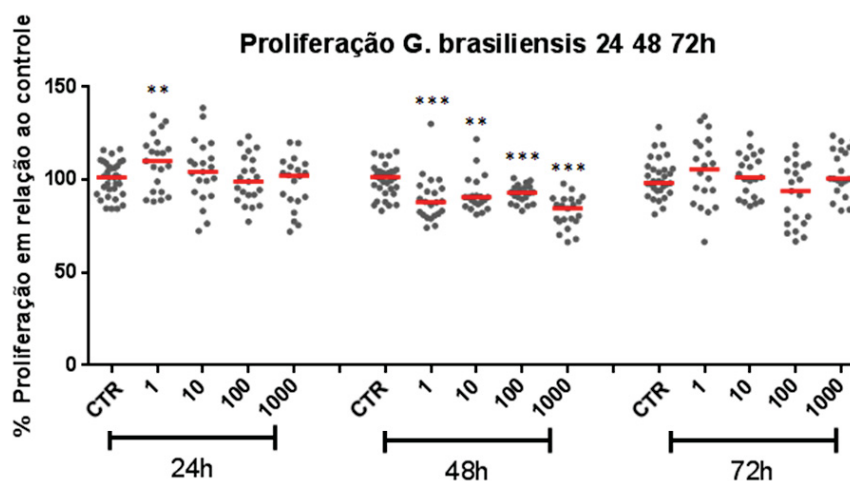


GRÁFICO 6 – Ensaio de Proliferação Celular. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000µg/mL, por tempo de exposição de 24,48 e 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, com mínimo de triplicata técnica de cada uma das concentrações em cada ensaio. A análise estatística foi realizada pelos testes de normalidade de D’Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, e então a comparação entre os grupos com teste de Mann Whitney (significância de ***= $p < 0,0001$). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

A diminuição da proliferação celular de linhagens cancerígenas é amplamente relatada na literatura, porém esta não é uma característica sempre presente em polissacarídeos com potencial antitumoral. Em um estudo utilizando polissacarídeos sulfatado e ricos em fucose, extraídos das algas marrons *Sargassum henslowianum* e *Fucos vesiculosus*, foi evidenciado diminuição na proliferação da linhagem B16-F10 de forma concentração dependente após 24h de tratamento com os compostos, em concentrações variando de 0.1mg/mL a 1mg/mL. Os polissacarídeos também induziram até 43% mais apoptose em relação ao grupo controle após o mesmo período de tratamento (ALE *et al*, 2011). Por outro lado, em um estudo conduzido por Jiao e colaboradores (2009) empregando um polissacarídeo extraído da alga *Enteromorpha intestinalis*, este não gerou diminuição significativa da proliferação da linhagem de sarcoma 180 em ensaios *in vitro*, empregando concentrações de 50 a 800ug/mL por 48h de tratamento. Nos ensaios *in vivo*, camundongos inoculados com células de sarcoma 180 foram tratados por 10 dias com doses de 100,200 e 400mg/kg, resultando na diminuição do peso tumoral em 61.17%, 67.65% e 70.59%, respectivamente (JIAO *et al*, 2009).

É interessante notar que alguns artigos na literatura utilizam as técnicas de MTT e vermelho neutro como forma de verificar a proliferação celular. Liu e colaboradores (2006) isolaram um polissacarídeo hidrossolúvel de uma espécie de equinodermo e testaram sua atividade em estudos *in vivo* utilizando camundongos inoculados com a linhagem de sarcoma 180. Em um dos experimentos, a fim de verificar a atividade imunomoduladora do composto, a proliferação de esplenócitos retirados dos animais foi analisada através do método de MTT (LIU *et al.*, 2006). Em outro artigo, Zhang e colaboradores (2004) testaram um polissacarídeo obtido da espécie vegetal *Lycium barbarum* na linhagem de hepatoma humano QGY7703, também empregando a técnica de MTT para verificar a inibição da proliferação causada pelo composto testado (ZHANG *et al*, 2004). Como discutido anteriormente, diferentes técnicas de viabilidade/citotoxicidade analisam diferentes parâmetros celulares. Os métodos de MTT e vermelho neutro estão relacionados à atividade mitocondrial e ao sistema lisossomal das células, respectivamente. O ensaio de cristal violeta baseia-se na coloração do núcleo celular. Desta forma, a técnica empregada nesta dissertação para

verificar a inibição ou não da proliferação celular permitiu analisar especificamente esse parâmetro, fornecendo confiabilidade aos resultados.

O estudo de polissacarídeos com possíveis atividades antitumorais teve início no nosso grupo laboratorial através do trabalho de Biscaia e colaboradores (2012). No trabalho conduzido por Biscaia, ficou evidenciado que o comprometimento da viabilidade celular e a diminuição da proliferação da linhagem B16-F10 não foram pré-requisitos para a presença de outras atividades anti-tumorais. Por esse motivo e embasado em relatos na literatura, após os ensaios já apresentados aqui, optamos por utilizar as concentrações de 10 e 100µg/mL e o tempo de tratamento de 72h para a realização dos demais experimentos, pois estas condições apresentaram pouco ou nenhum efeito na viabilidade da linhagem em estudo, o que nos dá a segurança para buscar modulações de outras características malignizadas.

4.3 Potencial de Membrana Mitocondrial – Rhodamina 123

Mitocôndrias possuem um papel fundamental na manutenção da viabilidade celular, podendo influenciar a manutenção do estado homeostático ou induzir a apoptose, alterando, por exemplo, a produção de ATP, a permeabilidade e o potencial da membrana mitocondrial (LY *et al*, 2003).

O ensaio de apoptose/necrose mais comumente usado na literatura é o de marcação com anexina V/7-AAD, ligantes de fosfatidilserina e intercalante de DNA, respectivamente. Porém, a análise da fluorescência da rodamina 123 também é empregada para esse fim. Em um estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2004) empregando o extrato aquoso de um fungo da espécie *Trametes robiniophila*, nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, mostrou-se diminuição da viabilidade celular de ambas as células pelo ensaio de MTT, nos tempos de tratamento de 24,48 e 72h, com concentrações de 2 a 16mg/mL, assim como indução a apoptose inicial e tardia (necrose) nos tempos de tratamento de 24 e 48h, com concentrações de 2 a 8mg/mL, evidenciada de forma semelhante pelos ensaios de anexina V/7-AAD e rodamina 123 (ZHANG *et al.*, 2005).

A fim de verificar uma resposta inicial de indução à apoptose frente ao tratamento com as concentrações e tempo escolhidos para os demais ensaios dessa

dissertação, empregando os polissacarídeos CI e GB, o ensaio de acúmulo de rhodamina 123 na matriz mitocondrial foi empregado. O Gráfico 7 apresenta a análise do potencial de membrana mitocondrial da linhagem B16-F10 após 72h de exposição aos polissacarídeos em estudo. As concentrações de 10 μ g/mL e 100 μ g/mL do polissacarídeo CI aumentaram esse parâmetro em 6.5% e 18.1% em relação ao controle, respectivamente, evidenciando diferença de respostas mostradas por experimentos de viabilidade celular que têm funcionalidades da mitocôndria como ponto avaliado, e a importância da realização de diferentes técnicas, visto que o mesmo composto apresentou resultado de diminuição de viabilidade pelo método de vermelho neutro nas concentrações de 10 e 100 μ g/mL em 72h, o que não foi encontrado no método de MTT.

O polissacarídeo GB não alterou essa dinâmica celular de forma estatisticamente significativa. Esse resultado complementa a interpretação do que foi encontrado nos ensaios de MTT e VN para o composto GB, mostrando que apesar de certa citotoxicidade e perda de viabilidade evidenciada nesses experimentos colorimétricos, o tratamento com as concentrações de 10 e 100 μ g/mL em 72h não demonstra sinais de indução à apoptose celular da linhagem em estudo.

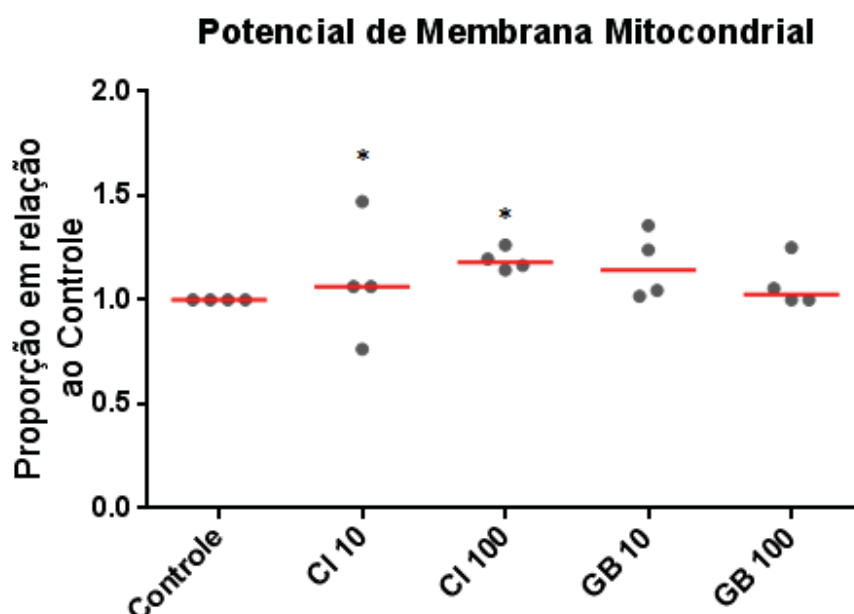


GRÁFICO 7 – Potencial de membrana mitocondrial. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e

100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, com análise de 10000 eventos em cada um em citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada por Mann Whitney (significância de $* = p < 0,05$). A linha vermelha representa a mediana dos dados coletados.

A apoptose é um mecanismo celular de fundamental importância no desenvolvimento embriológico e na manutenção da homeostase tecidual. Além disso, é usualmente ativa como uma barreira contra o desenvolvimento tumoral, eliminando células com danos em sua maquinaria. Esse processo é iniciado pela captação e interpretação de sinais extra e/ou intracelulares (via extrínseca e intrínseca) resultando na ativação das proteases caspases 8 e 9, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização rumo à morte celular programada. As células malignizadas desenvolvem modulações para transpor esses mecanismos. Um exemplo é através da superexpressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, suprimindo a atividade das proteínas Bax e Bak. Estas estão embebidas na membrana mitocondrial, e sua ativação causa o comprometimento da integridade desta membrana, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo-c, as quais por sua vez desencadeiam a ativação das caspases, dando sequência ao processo apoptótico. Muitas terapias anti-tumorais foram e ainda são desenvolvidas visando as vias de sinalização apoptóticas, porém a progressão das mesmas é muitas vezes impedida por seus efeitos colaterais, devido a sua falta de especificidade, afetando também células não malignizadas (HASSAN *et al*, 2014).

Em seu artigo de revisão sobre atividade antitumoral de polissacarídeos, Zong e colaboradores (2012) apresentam relatos na literatura de alguns desses compostos que induzem a apoptose celular, como por exemplo estudos *in vitro* de um polissacarídeo extraído da alga *Sargassum sp*, que induziu esse processo nas linhagens celulares B16-F10 e em carcinoma pulmonar de Lewis. As biomoléculas CI e GB não demonstram apresentar esse efeito na linhagem em estudo nesta dissertação. A ausência de comprometimento da sobrevivência das células frente aos tratamentos impostos nos dá segurança para prosseguir os estudos com esses polissacarídeos, visto que o cultivo celular das células expostas aos tratamentos não será inviabilizado pelos mesmos.

4.4 Ciclo Celular – Kit PI/RNase

Uma grande quantidade de relatos na literatura mostra a importância da perda do controle do ciclo celular no câncer. Entre as moléculas que controlam essa dinâmica, destacam-se as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e suas subunidades reguladoras. Fatores de crescimento estimulam a proliferação celular através da ativação da ciclina S CDK, a qual fosforila a proteína retinoblastoma (pRB), inativando-a e consequentemente diminuindo sua capacidade de inibição dos fatores transcricionais E2F, promovendo a progressão ou reentrada no ciclo celular. O contínuo processo replicativo gera instabilidades genômicas e cromossômicas, aumentando a possibilidade de acúmulo de mutações que promovem o fenótipo malignizado e consequentemente a progressão tumoral (MALUMBRES; BARBACID, 2005; HARBOUR, 2000).

Polissacarídeos de diferentes fontes, inclusive de algas, possuem relatos na literatura de arrasto do ciclo celular, tanto na fase G1, diminuindo a proliferação das linhagens estudadas, como em G2, associada a indução a apoptose (ZONG *et al*, 2012). A análise do ciclo celular da linhagem B16-F10 tratada com os polissacarídeos CI e GB nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h não apresentou modulação dessa dinâmica, como evidenciado pelo Gráfico 8, mostrando que esses compostos não possuem a atividade de arrasto do ciclo celular no modelo estudado.

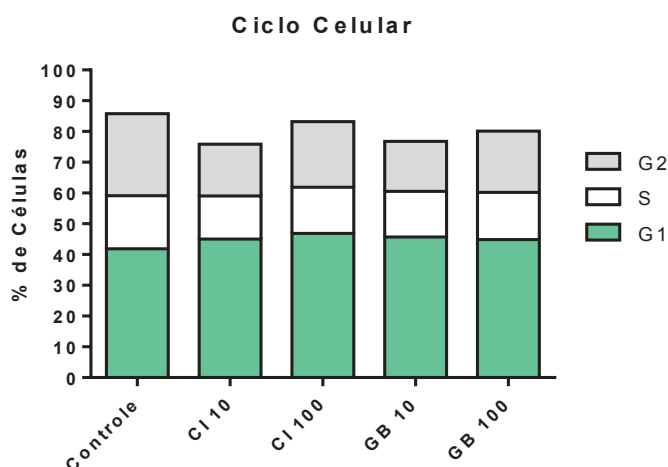


GRÁFICO 8 – Ciclo celular. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com análise de 10000 eventos em cada um em citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

4.5 Análise Morfológica – Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise da morfologia celular da linhagem em estudo frente aos tratamentos foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura.

O emprego da análise morfológica busca evidenciar possíveis alterações visíveis nas células, as quais podem servir de ponto de partida para outros ensaios, como é possível ver na literatura. Vayssade e colaboradores (2010) analisaram as atividades antitumorais de uma pectina extraída de quiabo tendo a linhagem B16-F10 como modelo. A análise morfológica feita em microscopia de luz com células tratadas por 48h com 0.1% do polissacarídeo revelou um menor número de agregados celulares e diminuiu o espreado das mesmas. Uma possível explicação para esse comportamento, segundo os autores, foi a diminuição na marcação de N-caderina e integrina α_5 , moléculas relacionadas, entre outras dinâmicas, na interação célula-célula e célula-substrato (VAYSSADE et al., 2009). Em outro estudo, um polissacarídeo obtido do fundo *Phellinus linteus* foi testado na linhagem B16-F10, nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL. Entre os resultados encontrados, o composto diminuiu a proliferação

celular de forma concentração-dependente e gerou arrasto do ciclo na fase G1, explicado pelos autores devido a diferenciação celular causada pelo polissacarídeo, evidenciada pela análise morfológica (a qual mostrou células com formas dendríticas, diferentemente do grupo controle) e pela maior expressão de melanina (a qual também seria um indicativo de diferenciação celular) (PARK; HAN; PARK, 2010).

A Figura 3 apresenta a morfologia das células da linhagem B16-F10 com os tratamentos dos polissacarídeos CI ou GB na concentração de 100µg/mL por 72h, ou na ausência deles (grupo controle), em três diferentes aumentos (500,2000 e 4000x).

Podemos observar que as células controles apresentam morfologia característica para esta linhagem: veem-se células de diferentes tamanhos, emitem expansões do corpo celular caracterizando células com diferentes morfologias, não respeitam inibição de contato, empilham umas sobre as outras, características estas de células tumorais.

Nas células expostas ao polissacarídeo CI, estas também mantêm morfologia semelhante à descrita para as células controles. Possuem diferentes tamanhos e morfologias, emitem projeções do corpo celular e expansões membranares. De forma interessante, após o tratamento com este polissacarídeo algumas células estão menores, mais arredondadas e parecem estar mais justapostas. Células expostas ao polissacarídeo GB evidenciam já na imagem de menor magnitude que estão em menor número quando comparadas com o controle ou com o tratamento CI. Estas células estão menos sobrepostas, dispostas de forma mais esparsa, mais aderidas ao substrato.

Em outro exemplo de associação entre diferenciação morfológica e modulação de características tumorigênicas, Mostafapour e colaboradores (2015) encontraram alterações promissoras após o tratamento da linhagem B16-F10 com um extrato de polissacarídeos obtidos de estrelas do mar. Utilizando concentrações de 7.5 a 250µg/mL com tempos de tratamento de 24 a 72h, esse extrato diminuiu a proliferação celular de forma significativa (avaliada pelos autores através do ensaio de MTT); gerou alterações morfológicas na linhagem celular, as quais adotaram uma aparência dendrítica; induziu apoptose celular (detectada pela marcação com PI em citometria de fluxo), confirmada também por maiores taxas de atividade enzimática de caspase-3; aumentou os níveis de produção de melanina e acúmulo de protoporfirina IV e maiores

níveis de expressão de MITF (Fator de Transcrição Associado a Microftalmia) (MOSTAFAPOUR *et al.*, 2015). A associação entre diferenças morfológicas causadas por tratamentos com polissacarídeos e a modulação de outras mecânicas células é então relatada na literatura, o que permite traçarmos outros experimentos para estudar os compostos relatados nesta dissertação além dos já executados.

Uma possível abordagem para se buscar frente a alteração morfológica causada principalmente pelo polissacarídeo GB, são as alterações em moléculas relacionadas a adesão célula-célula e célula-matriz, as quais possuem consequências em diversas mecânicas celulares, como por exemplo a migração celular. Alguns exemplos são as E-caderinas e N-caderinas (esta teve sua marcação avaliada com sucesso neste trabalho), as quais passam por uma alteração de expressão em células malignizadas, sendo a primeira substituída pela segunda, gerando perda de interação célula-célula (VOULGARI e PINTZAS, 2009) e as integrinas α_v , as quais têm sua expressão aumentada na linhagem B16-F10 e estão associadas, entre outros mecanismos, ao processo metastático e a interação célula-matriz (QUIAN *et al.*, 2005).

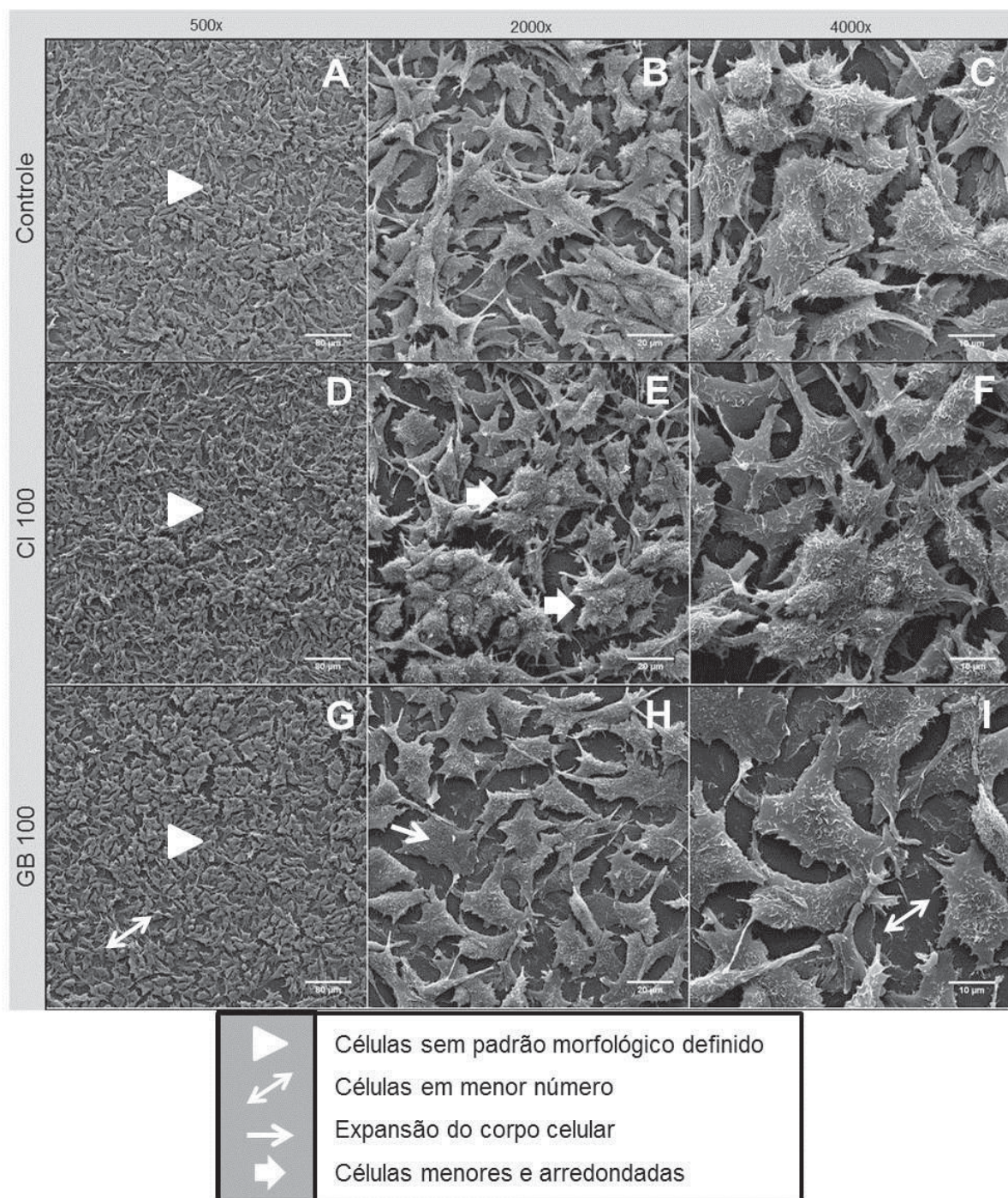


FIGURA 3 – Morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* na concentração de 100µg/mL por 72h. Controle (A, B e C); CI (D, E e F); GB (G, H e I).

4.6 Ensaio de formação de colônias

O ensaio de formação de colônias, também denominado de ensaio clonogênico, é utilizado a mais de 50 anos para analisar a capacidade proliferativa e de formação de colônias de células malignizadas após o tratamento com radiação ou drogas, sendo hoje muito utilizado para estudos pré-clínicos de compostos anti-tumorais (FRANKEN *et al*, 2006). Este experimento apresenta diferentes protocolos na literatura, utilizando o plaqueamento direto em placas de cultura, até o uso de componentes que aumentam a complexidade do ambiente em que as células irão proliferar, como o uso de ágar e de matrizes sintéticas - como o algimatrix.

O Gráfico 9 apresenta o resultado do número de colônias formadas após o tratamento ou não com os polissacarídeos CI e GB nas concentrações de 10 e 100µg/mL, por 72h. Nenhum dos polissacarídeos modulou de forma significativa essa dinâmica celular, apesar de haver um perfil de diminuição da formação de colônias frente ao tratamento com o polissacarídeo CI na concentração de 100µg/mL. Os dados aqui apresentados correspondem a apenas dois experimentos independentes, e talvez o aumento do N amostral possa evidenciar uma alteração estatisticamente significativa para esse tratamento.

É possível encontrar na literatura estudos de atividades biológicas de polissacarídeos que utilizam o ensaio de colônia como um dos parâmetros avaliados. Em um estudo conduzido por Chen e colaboradores (2013), um polissacarídeo extraído das micelas do fungo *Rhizopus nigricans* diminuiu a capacidade da formação de colônias da linhagem celular BGC-823, de câncer estomacal. Nesse experimento, os autores plaquearam 100 células por poço de uma placa de 24 poços e tratadas por 24h com concentrações de 200, 400 e 600µg/mL do composto, então o meio de cultura foi substituído e as células proliferaram por 10 dias, seguindo-se para coloração com cristal violeta e contagem do número de colônias formadas. Os tratamentos diminuíram a formação de colônias de forma concentração-dependente. Além disso, esse polissacarídeo também gerou arrasto do ciclo celular na fase G2/M, e induziu a perda do potencial de membrana mitocondrial das células, em um experimento semelhante ao realizado nesta dissertação, mas utilizando o marcador JC-1 ao invés da rodamina 123 (CHEN *et al*, 2013).

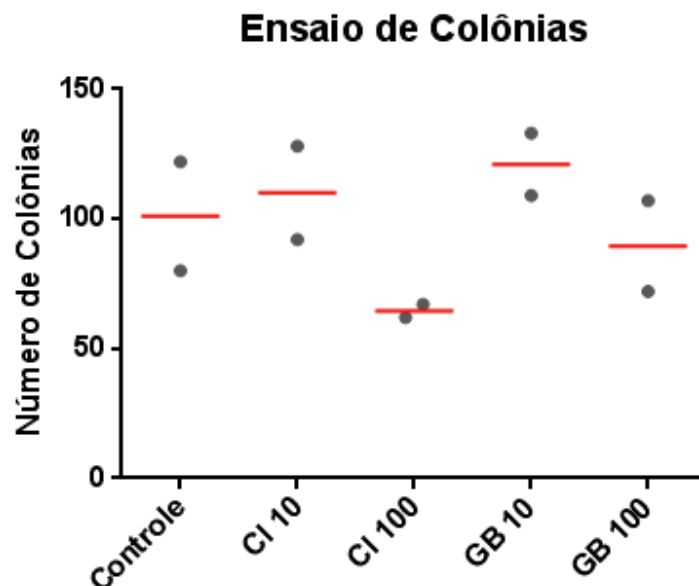


GRÁFICO 9: Ensaio de Colônias. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de dois experimentos independentes. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney. As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

4.7 Migração

O Gráfico 10 mostra a análise do ensaio de migração realizado pelo método de *scratch* com imagens obtidas no equipamento *Incuzyte Zoom*, durante 15h de análise. A análise estatística feita com teste T pareado aponta que o polissacarídeo CI não modulou essa dinâmica celular em nenhuma das duas concentrações testadas, em 72h de exposição, de forma estatisticamente significativa. O polissacarídeo GB, na concentração de 100µg/mL diminuiu de forma estatisticamente significativa a migração celular quando em comparação ao grupo controle.

As Figuras 4 e 5 apresentam imagens do ensaio de migração celular por *scratch* realizado no mesmo equipamento. Todas as fotos apresentadas provêm de um mesmo experimento biologicamente independente. O Polissacarídeo CI não modulou essa dinâmica celular em nenhuma das concentrações testadas (10 e 100µg/mL) no período de 72h de tratamento (Figura 4). O polissacarídeo GB diminuiu de forma estatisticamente significativa a migração celular, quando utilizado na concentração de 100µg/mL. Na Figura 5, o grupo controle apresenta 2.17% de área de *scratch* não

coberta, contra 23.6% do poço tratado com o polissacarídeo GB na concentração de 100µg/mL.

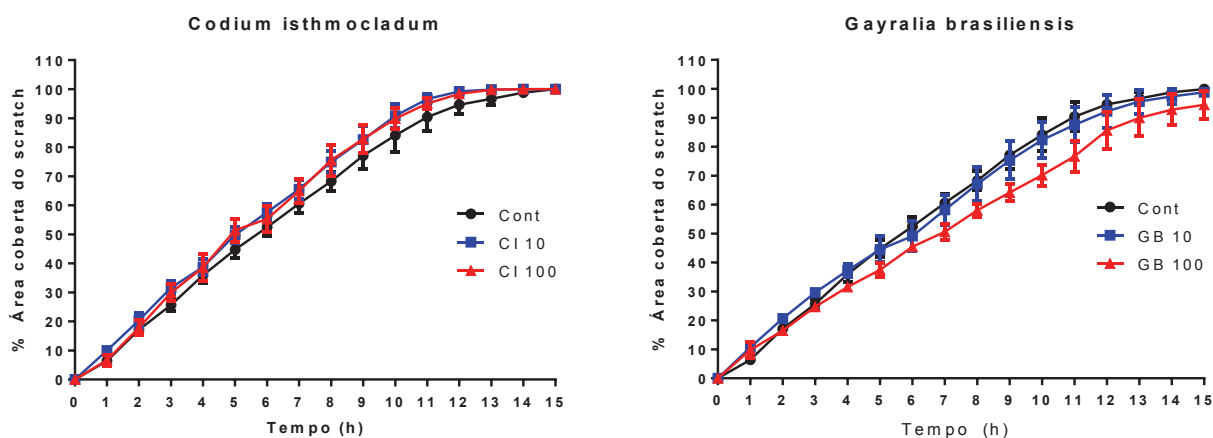


GRÁFICO 10 – Migração celular. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, com plicata técnica cada um. A análise dos dados foi feita através do teste T pareado. Os pontos nos gráficos representam a mediana dos dados com o desvio.

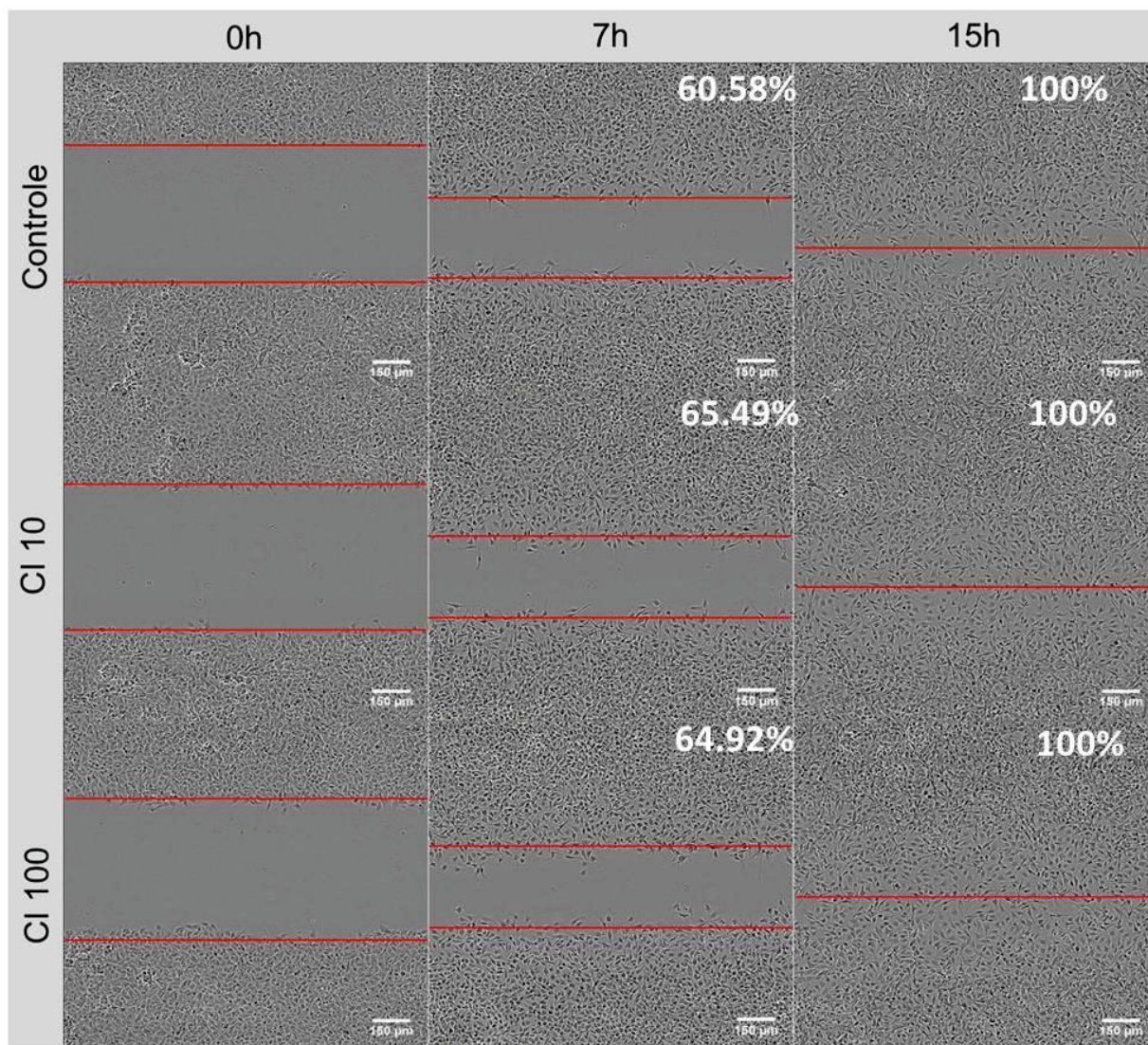


FIGURA 4 – Migração celular. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* nas concentrações de 10 e 100μg/mL por 72h, e foi então realizado o ensaio de migração através do método do scratch, acompanhado por 15h pelo equipamento Incucyte Zoom. Todas as imagens acima são resultado de um mesmo experimento biológico, e as porcentagens representam a média dos quatro ensaios.

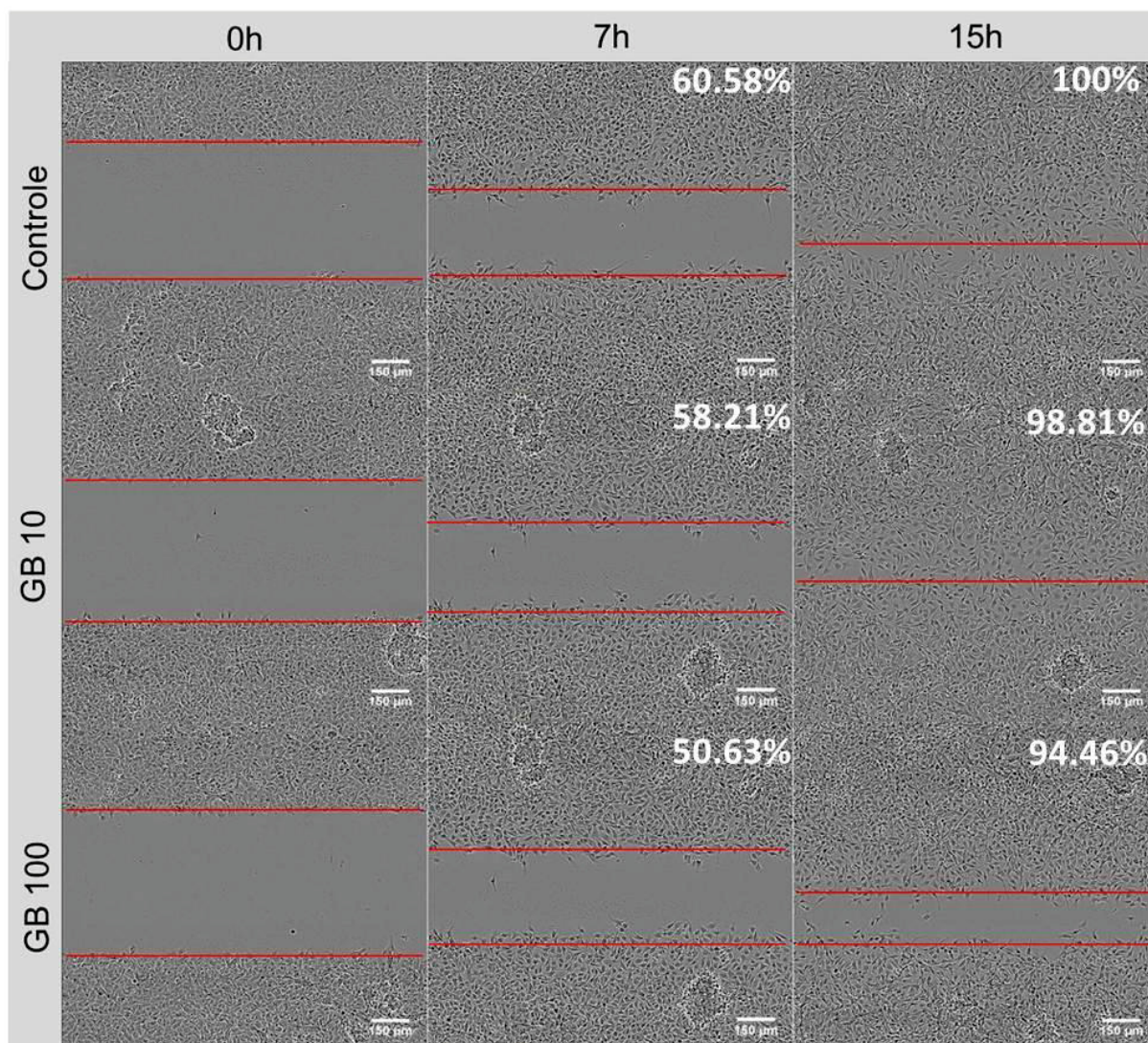


FIGURA 5 – Migração celular. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100μg/mL por 72h, e foi então realizado o ensaio de migração através do método do scratch, acompanhado por 15h pelo equipamento Incucyte Zoom. Todas as imagens acima são resultado de um mesmo experimento biológico, e as porcentagens representam a média dos quatro ensaios.

Os dois procedimentos de ensaio de migração realizados neste trabalho são conhecido como “*wound healing assay*”, ou “*scratch assay*”, pois um risco (*scratch*) é feito na monocamada celular, e então o fechamento do mesmo é acompanhado, correspondendo a migração celular.

Esse tipo de procedimento é amplamente utilizado e relatado na literatura.

Utilizando a linhagem B16-F10 como modelo de estudo, Dias e colaboradores (2004) analisaram os efeitos do tratamento com um polissacarídeo extraído da alga marrom *Sargassum stenophyllum* em estudos *in vitro* e *in vivo*. No ensaio de migração, utilizando o mesmo princípio do método adotado nesta dissertação, um risco foi feito em células em monocamada, e estas foram tratadas com 50, 100 e 200 µg/mL por 12h, período no qual foram tiradas fotos da placa para acompanhar o fechamento do *scratch*. De forma concentração-dependente, o polissacarídeo diminuiu de 55% a 95% da migração celular. Além disso, outros resultados são relatados: com três dias de tratamento em concentrações variando de 50 a 2000 µg/mL, a linhagem B16-F10 apresentou perda de 21% da viabilidade na maior concentração, relatado pelo método de MTT; através do modelo tumoral subcutâneo, a inibição estatisticamente significativa do crescimento tumoral ficou evidenciada, utilizando as concentrações de 1.5 e 150 µg em 100 µL por animal em doses diárias únicas, durante 15 dias de tratamento (DIAS *et al*, 2005). Além de demonstrar o uso do método de *scratch* para analisar a migração, o artigo de Dias e colaboradores também apresenta outros resultados promissores de um composto que modulou a movimentação da linhagem B16-F10.

O ensaio de migração também pode ser feito com o uso de *transwell*. Lee e colaboradores (2014) testaram os efeitos de um polissacarídeo obtido do fungo *Inonotus obliquus* em algumas dinâmicas celulares na linhagem B16-F10. O ensaio de migração foi realizado de duas formas: de forma semelhante a apresentada nesta dissertação, células plaqueadas em placas de 6 poços foram mantidas em incubadora de CO₂ até sua confluência, sendo então tratadas com concentrações de 0.25, 50 e 100 µg/mL, simultaneamente a execução de um risco no centro dos poços, procedendo-se então para fotografia dos mesmos pontos em 0h, 24h e 48h; de forma alternativa, a porção inferior de *transwells* foram sensibilizadas com quimioatratante, e células B16-F10 foram plaqueadas na porção superior, tratadas ou não com o polissacarídeo nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL e permitidas migrar por 24h, procedendo-se então para remoção das células que não migraram, fixação da membrana do transwell, coloração das células aderidas na porção inferior, utilizando cristal violeta, e obtenção de imagem das mesmas (LEE *et al*, 2014). Em ambos os casos, a migração da linhagem B16-F10 diminuiu de forma estatisticamente significativa em relação ao

controle, e as duas técnicas apresentaram proximidade nos resultados.

O ensaio de migração celular busca evidenciar modulações em uma das etapas mais críticas da progressão tumoral: a metastase – disseminação de células cancerígenas para órgãos distantes do tumor primário – que é a maior responsável por mortes relacionadas ao câncer. Esse processo ocorre através da invasão das células cancerígenas pelo tecido onde se encontra o tumor primário, migração das mesmas através das fibras de matriz extracelular (ECM) e nova invasão pela parede dos vasos sanguíneos. O passo inicial da migração celular corresponde a protusão da membrana, tanto *in vitro* – através de lamelipódios – como *in vivo* – através de pseudopodes - a qual é desencadeada por reorganização do citoesqueleto de actina. As protusões aderem a componentes da ECM através da formação de complexos aderentes, compostos de diferentes receptores de superfície celular, como integrinas e lamininas. Para transpor a membrana basal que cobre os vasos sanguíneos, as protusões celulares assumem o formato de invadopódios, que concentram a atividade de metaloproteinases (MMPs), permitindo a degradação e o remodelamento da ECM ali presente (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005).

Visto que a diminuição da migração celular da linhagem B16-F10 frente ao polissacarídeo GB é um resultado muito promissor para essa molécula, a busca das alterações moleculares por trás desse fenômeno é de grande interesse.

Entre os receptores de superfície celular mais amplamente estudados por sua atuação no processo migratório e invasivo, estão as integrinas. Estas são uma das mais importantes famílias de proteínas associadas à interação com moléculas da matriz extracelular (EMC). São compostas de duas subunidades – α e β – as quais podem formar pelo menos 24 pareamentos, para certo grupo de ligantes – como por exemplo o dímero $\alpha_v\beta_3$, o qual interage com várias moléculas EMC – ou de forma mais específica – como o dímero $\alpha_5\beta_1$, que interage com fibronectina - e tendo uma distribuição diferenciada em cada tecido. (revisado por CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011).

O papel das integrinas é amplo nos processos migratórios e invasivos. Há uma interação dinâmica entre as integrinas e o citoesqueleto de actina, mediada por proteínas acessórias, gerando um fenótipo polarizado da célula, com esses

componentes se concentrando na região anterior, no sentido da migração. Nos passos iniciais da invasão de muitos tumores epiteliais, ocorre o aumento da expressão de integrinas $\alpha_6\beta_4$ e o acúmulo das mesmas em pontos focais, os quais interagem com monômeros polimerizados de laminina, facilitando a motilidade celular e o processo invasivo. Além disso, alterações na expressão de integrinas estão associadas a atividade de metaloproteinases, as chamadas MMPs. Essas proteínas são secretadas em sua forma inativa, e sua ativação depende da ligação a complexos protéicos presentes na superfície celular. Em melanomas, gliomas e células endoteliais que promovem a angiogênese, o dímero $\alpha_v\beta_3$ está presente nesses *clusters*, participando portanto da ativação das MMPs exatamente no local necessário – a porção “anterior” da célula invasiva (revisado por HOOD; CHERESH, 2002).

A literatura também relata a interação entre integrinas e outras moléculas capazes de mediar a migração celular. Em um estudo conduzido por Makagiansar e colaboradores (2007) utilizando a linhagem U-251 de glioblastoma, os autores mostram diferentes dinâmicas celulares envolvendo o proteoglicano NG2 e a integrina β_1 : de acordo com o sítio de fosforilação ativo do NG2 e a resultante colocalização com a integrina β_1 , esse pode promover a proliferação celular ou a migração; neste último caso, a colocalização dos receptores ocorre na porção anterior dos lamelipódios de células em movimentação (MAKAGIANSAR et al., 2007). A marcação desse proteoglicano em citometria de fluxo foi realizada nesta dissertação afim de verificar se a modulação da migração celular está relacionada a alterações na marcação dessa molécula, e o resultado está exposto adiante.

Visto o papel das integrinas na adesão e migração celular e o resultado aqui apresentado, uma interessante perspectiva futura seria analisar a expressão e a marcação das subunidades de integrina, principalmente os componentes do dímero $\alpha_v\beta_3$. A marcação da subunidade α_v da integrina foi realizada, porém sem sucesso, provavelmente devido a não funcionalidade do anticorpo utilizado.

Outra importante família de proteínas associadas a adesão célula-célula e motilidade celular é a das caderinas. Em tecidos epiteliais normais, essas proteínas promovem a integridade tecidual, mantida através de junções de adesão e

desmossomos. Essa mediação é feita através da porção intracelular das caderinas, associadas ao citoesqueleto de actina através das β -cateninas. Em situações de neoplasias, mutações e o silenciamento da expressão de E-caderina promovem perda de homeostase tecidual, a qual normalmente é acompanhada do aumento da expressão de N-caderina, aumentando a motilidade e a invasão celular (revisado por WEELOCK *et al*, 2008). Logo, a marcação dessas moléculas seria interessante para tentar explicar as menores taxas de migração da linhagem B16-F10 frente ao polissacarídeo GB aqui demonstradas. A marcação por citometria de fluxo das duas moléculas foi feita, e os resultados para N-caderina serão apresentados adiante. A marcação para E-caderina não foi realizada com sucesso.

A glicoproteína CD44 também possui relatos na literatura de sua atividade na migração celular. O gene responsável por sua expressão contém mais de 20 exons em ratos, e o transcrito pode sofrer várias formas de regulação pós-transcricional, o que confere a essa molécula uma grande variedade de epítomos. Seu principal ligante na ECM é o ácido hialurônico, porém também ha interação com várias outras moléculas, como colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina e condroitin sulfato (revisado por NAOR *et al.*, 2008).

Em estudos *in vitro*, células migratórias apresentam maior expressão de CD44 na região polarizada “anterior”. A interação CD44-ácido hialurônico é regulada por outras proteínas, como enzimas proteolíticas, que clivam porções do receptor, liberando a migração celular. Estudos também mostram que o ácido hialurônico pode ser captado pelas células por intermédio do CD44, mostrando que esta glicoproteína também participa do remodelamento da EMC, provavelmente influenciando a adesão das células à matriz (revisado por PONTA; SHERMAN; HERRLICH, 2003).

Desta forma, a marcação de CD44 também pode ser um ponto de interesse para explicar os resultados obtidos no ensaio de migração deste trabalho, e esta foi realizada, como mostrado adiante.

O mesmo modelo experimental foi repetido utilizando o microscópio de varredura a laser confocal A1R MP (Nikon) para captura das imagens, a qual foi feita durante 15h,

com fotos adquiridas a cada 20 minutos. O polissacarídeo GB novamente resultou em diminuição da migração celular da linhagem B16-F10, na ordem de 20.76% (média dos dois experimentos realizados) quando comparada ao grupo controle (Gráfico 11 e Figura 6).

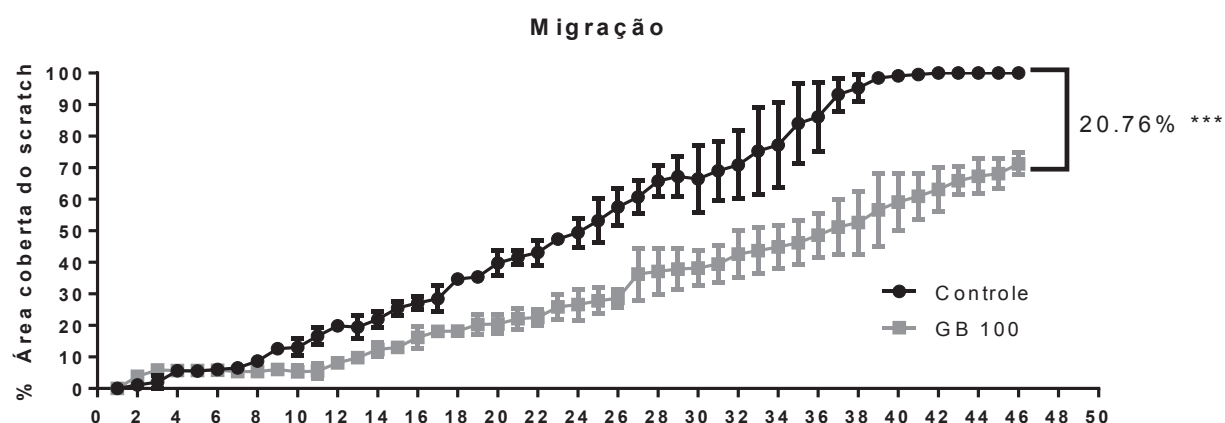


GRÁFICO 11: Migração celular. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* na concentração de 100µg/mL por 72h, e foi então realizado o ensaio de migração através do método do scratch, acompanhado por 15h no microscópio de varredura a laser confocal A1R MP (Nikon), com fotos sendo adquiridas a cada 20 minutos, em dois experimentos independentes. Os pontos no gráfico representam a mediana dos dados. A análise estatísticas foi feita pelo Teste t pareado (***) para $p < 0,009$).

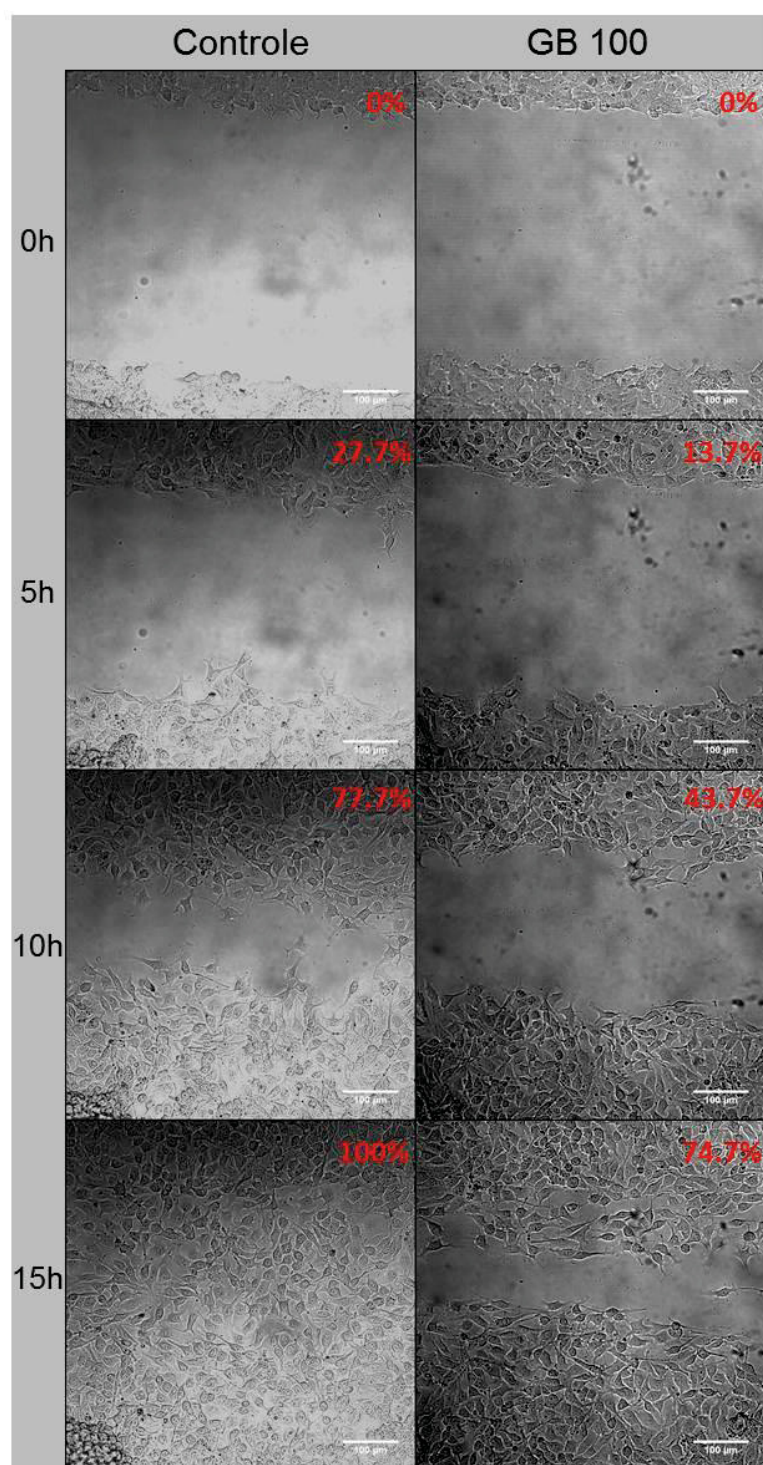


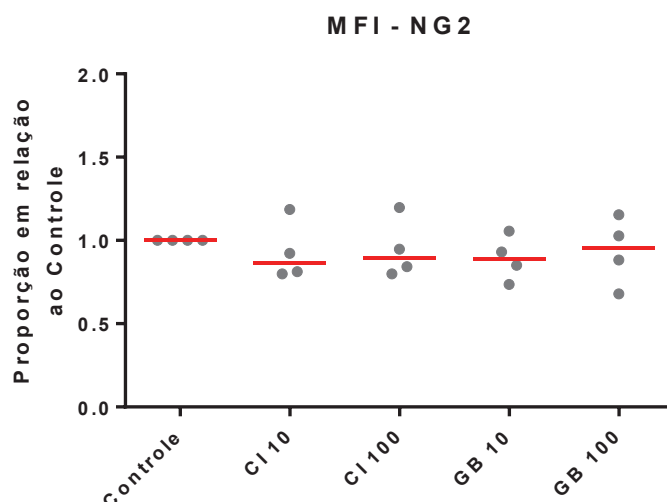
FIGURA 6 –Migração celular. As células B16-F10 foram expostas a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* na concentração de 100µg/mL por 72h, e foi então realizado o ensaio de migração através do método do scratch, acompanhado por 15h no microscópio de varredura a laser confocal A1R MP (Nikon), com fotos sendo adquiridas a cada 20 minutos. Todas as imagens acima são resultado de um mesmo experimento biológico, e os valores em porcentagem representam a área coberta do *scratch*. A análise

estatísticas foi feita pelo Teste de Mann Whitney.

4.8 Imunomarcacão – NG2

O Proteoglicano de condroitim sulfato NG2 é um receptor de membrana altamente glicosilado, relacionado a estados fisiológicos e patológicos como o câncer, estando mais expresso em metástases do que no tumor primário, sendo identificado em aproximadamente 85% de lesões de melanoma e em linhagens celulares desse tipo. Através de interações célula-célula e célula-matriz, esse receptor apresenta capacidade de regulação de sinais de adesão, migração, proliferação e angiogênese. Sua atuação na migração está principalmente relacionada com a interação dessa molécula à integrinas, modulando a afinidade por ligantes da matriz extracelular, principalmente de colágeno IV (revisado por BIE *et al.*, 2014).

O tratamento com os polissacarídeos CI ou GB não alterou de forma estatisticamente significativa a marcação do proteoglicano NG2 na linhagem celular em estudo em nenhuma das concentrações e tempo testados (Gráfico 12), mostrando que a modulação da dinâmica de migração celular exercida pelo polissacarídeo GB não ocorreu devido a alterações nessa molécula.

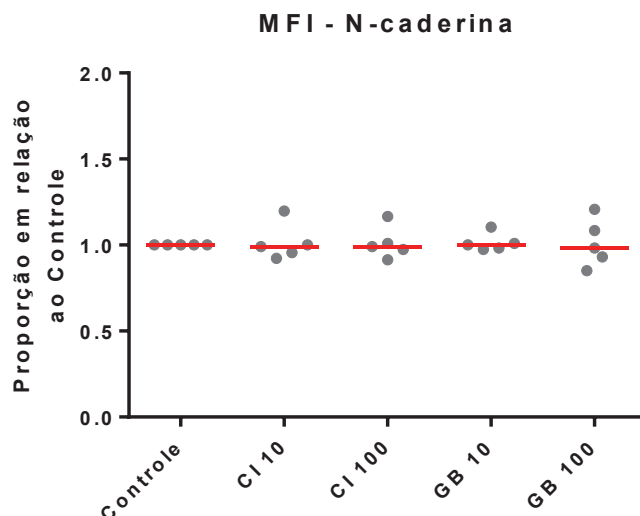


GRÁFICO 12 – Imunomarcação de NG2. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100 g/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, sendo que 10000 eventos em cada ensaio foram contabilizados em citometria de fluxo. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney. As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

4.9 Imunomarcação – N-caderina

A migração celular é um importante processo ao longo de toda a vida de um organismo, participando desde a embriogênese, passando pela defesa imunitária e estando presente também em estados patológicos, como o câncer. Grande parte desse processo ocorre pelo fino controle da expressão e funcionamento das mais de 80 proteínas que constituem a família das caderinas. Dentro desse grupo de proteínas associadas a interações célula-célula e célula-matriz, as N-caderinas têm um papel de destaque na progressão tumoral, estando associadas a fenótipos mais migratórios e invasivos (revisado por DERYCKE; BRACKE, 2004).

A diminuição da marcação de N-caderinas poderia ser um dos motivos para a menor taxa de migração encontrada após   exposição da linhagem B16-F10 ao polissacarídeo GB, porém o tratamento com os compostos CI ou GB não alterou de forma estatisticamente significativa a marcação dessa proteína em nenhuma das concentrações e tempo testados (Gráfico 12).



GRÁFICO 13 – Imunomarcação de N-caderina. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100 g/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de cinco experimentos independentes, sendo que 10000 eventos em cada ensaio foram contabilizados em citometria de fluxo. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney. As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

Como discutido anteriormente, a progressão tumoral de muitos tipos de câncer epiteliais é acompanhada de uma diminuição da expressão ou perda de função de E-caderinas e aumento da expressão de N-caderinas. Logo, apesar de não ter sido evidenciado uma diminuição na marcação de N-caderina em resposta ao tratamento com o polissacarídeo GB, a marcação de E-caderina poderia apresentar alguma modulação. A análise da quantidade de E-caderina na superfície celular foi realizada sem sucesso nesta dissertação, e a repetição desse ensaio é uma das perspectivas futuras do trabalho

Outro ponto válido para verificar a participação ou não da modulação da N-caderina influenciando os resultados da migração, seria verificar a funcionalidade da mesma, buscando a marcação de proteínas acessórias a ela. O complexo protéico formado pelas caderinas   constituído por outras moléculas, como por exemplo a catenina-p120 e a β -catenina, ambas associadas à região intracelular C terminal das caderinas, e a α -catenina, a qual conecta a β -catenina ao citoesqueleto de actina (revisado por WEELOCK *et al*, 2008). A marcação por imunofluorescência de β -

catenina para visualização em microscópio a laser confocal foi realizada sem sucesso neste trabalho, provavelmente devido a falta de atividade do anticorpo utilizado.

4.10 Imunomarcação – CD44

O receptor CD44 está presente na maioria das células dos vertebrados, participando de processos fisiológicos normais, como o desenvolvimento de órgãos, direcionamento de axônios, hematopoiese, e de patologias, como o câncer. Apresenta muitas isoformas, devido a alterações pós-transcricionais e pós-traducionais. Suas interações com o citoesqueleto são mediadas por um grande grupo de proteínas: a anquirina promove a ligação com a proteína espectrina, a qual está ligada ao citoesqueleto de actina; proteínas da família ERM (ezrina, radixina e moesina) se associam entre a porção transmembrana do receptor e as anquirinas, também promovendo a ligação com o citoesqueleto de actina. Seu principal ligante na matriz extracelular (ECM) é o ácido hialurônico, e sua afinidade por esse glicosaminoglicano e a outros componentes da ECM podem ser controladas intracelularmente, através da formação de *clusters* de CD44, promovendo maior ou menor afinidade aos ligantes, modulando processos de adesão, migração celular e invasão celular (revisado por PONTA; SHERMAN; HERRLICH, 2003).

O tratamento com o polissacarídeo CI não alterou, de forma estatisticamente significativa, a marcação do receptor CD44 na linhagem em estudo, frente às concentrações testadas (10 e 100µg/mL) e tempo de tratamento (72h). Já o composto GB, na concentração de 100µg/ml, diminuiu essa marcação em 22.9% em relação ao controle, valor esse estatisticamente significativo (Gráfico 14).

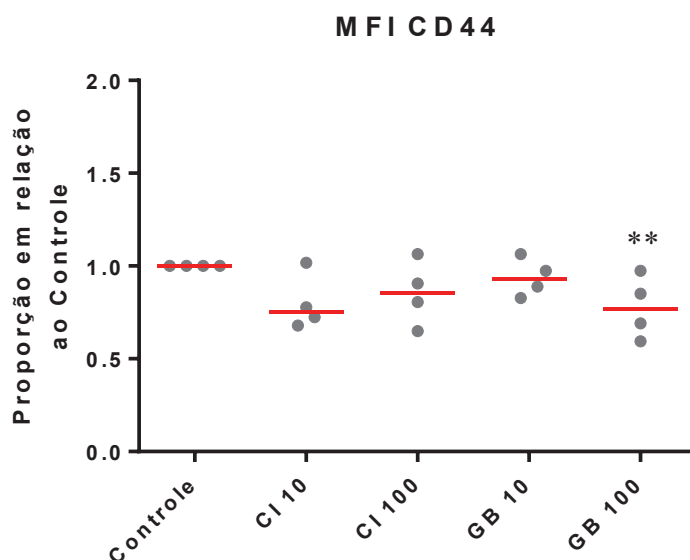


GRÁFICO 14 – Imunomarcacão de CD44. As células B16-F10 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, sendo que 10000 eventos em cada ensaio foram contabilizados em citometria de fluxo. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (para ** $p < 0,0048$). As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

A diminuição da marcação de CD44 em resposta ao tratamento com o polissacarídeo GB pode ser uma das explicações para a diminuição da migração vista em resposta ao mesmo tratamento, visto o papel desse receptor na migração celular. A comprovação desta afirmação é uma das perspectivas futuras desse trabalho. Caso a diminuição de CD44 na superfície celular esteja sendo causada por uma regulação transcricional, a análise por PCR da expressão gênica de CD44 (que apesar de possuir várias isoformas, é codificado por um único gene) pode ser um resultado interessante para este trabalho.

A diminuição da marcação de CD44 em resposta à exposição ao polissacarídeo GB pode ainda levar a outras modulações promissoras. Em um estudo utilizando a linhagem de carcinoma mamário murino (TA3) e a linhagem de melanoma humano MC, Yu e colaboradores (1999) demonstraram que *clusters* de CD44 se colocam com a metaloproteinase MMP-9 secretada pelas células, e quando essa colocação ocorria

com receptores funcionais, havia maior crescimento e metástases tumorais (utilizando o modelo tumoral com células TA3 em ratos) e maior taxa de invasão (utilizando a linhagem de melanoma humano MC no modelo de invasão de monocamada de mioblastos) (YU; STAMENKOVIC, 1999). Logo, a diminuição da marcação desse receptor frente ao tratamento com o polissacarídeo GB pode gerar outros resultados promissores. O ensaio de invasão celular através de uma matriz de matrigel é um dos possíveis experimentos *in vitro* para analisar uma possível modulação da dinâmica de invasão celular pelo composto aqui estudado.

4.11 Imunomarcação e ROS em macrófagos

Entre as atividades antitumorais de polissacarídeos obtidos de fontes naturais, muitos relatos na literatura apontam para o aumento da imunocompetência dos pacientes e a imunopotenciação em combinação com quimioterapias. Os efeitos modulatórios do sistema imune em resposta a esses compostos são evidenciados em diferentes tipos celulares, como em macrófagos, leucócitos e células *natural killers* (NK), além da alteração da expressão do perfil de citocinas, levando por exemplo à diminuição do processo inflamatório associado ao microambiente tumoral (ZONG, CAO e WANG, 2012).

Entre as atividades imunomodulatórias descritas na literatura em resposta ao tratamento com polissacarídeos, a modulação de macrófagos é uma das mais recorrentes. Entre essas, destacam-se o estímulo a fagocitose e o aumento da atividade dessas células, seja por super produção de espécies reativas de oxigênio ou por alteração do perfil de expressão de receptores de superfície celular (WIJESEKARA *et al*, 2010).

A fim de encontrar possíveis atividades modulatórias da atividade de células do sistema imune frente aos polissacarídeos utilizados neste trabalho, a linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi utilizada nos experimentos de imunomarcação do receptor CD54 e na análise da produção de espécies reativas de oxigênio.

A interação entre macrófagos e câncer é amplamente estudada, sendo que

essas células são uma das mais abundantes no microambiente do tumor. Os macrófagos são um componente essencial da resposta imune inata, e através de sua plasticidade frente a estímulos extracelulares, adquirem diferentes fenótipos, podendo atuar contra ou a favor da progressão tumoral. As subpopulações dessas células são, de forma simplificada, divididas em dois tipos, de acordo com sua forma de ativação: M1, ou ativação clássica; e M2, ou ativação alternativa. A subpopulação M1 apresenta funcionalidades anti-tumorais, promovendo a ativação de linfócitos T1 e células NK, induzindo a destruição do tumor e do tecido adjacente. Por outro lado, a subpopulação M2, a qual representa a maior parte presente no microambiente tumoral, tem atividades pró-tumorais, indiretamente auxiliando na angiogênese, invasão e crescimento das células cancerígenas (revisado por BISWAS; MANTOVANI, 2010).

4.11.1 Imunomarcção em macrófagos – CD54

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, também denominada CD54) é uma glicoproteína transmembrana expressa constitutivamente em leucócitos e células endoteliais, que atua na interação célula-célula e célula-matriz através da ligação a integrinas da família $\beta 1$. Esse receptor possui funções relacionadas à resposta imune inata e a adquirida, participando da migração transendotelial de leucócitos, da apresentação de antígenos à células T e de cascatas de sinalização em resposta a ligantes extracelulares (LAWSON; WOLF, 2009).

Como evidenciado pelo Gráfico 15, o tratamento com o polissacarídeo CI aumentou a marcação do receptor CD54 em 28% em relação ao controle, quando utilizado na concentração de 100 μ g/mL, em 72h de tratamento. Da mesma forma, o composto GB também aumentou a quantidade de marcação, em 54% e 57%, nas concentrações de 10 e 100 μ g/mL, respectivamente. Todas essas variações foram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle.

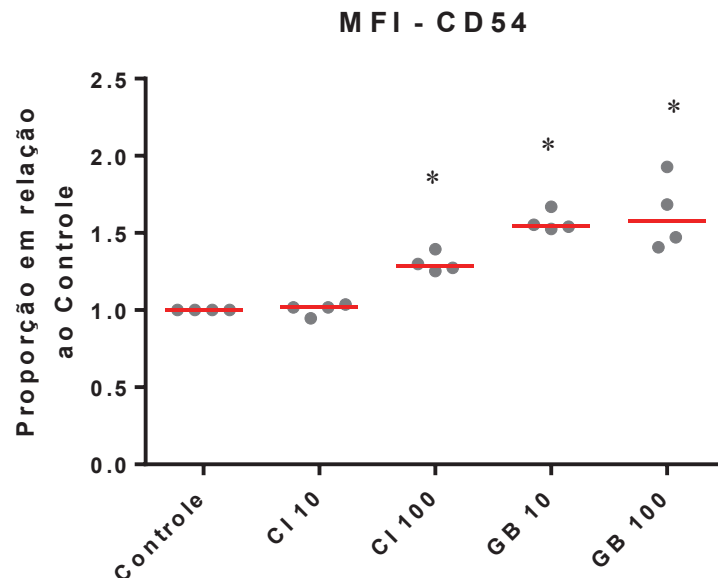


GRÁFICO 15 – Imunomarcagem de CD54. As células RAW 264.7 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, sendo que 10000 eventos em cada ensaio foram contabilizados em citometria de fluxo. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (para * $p < 0,0286$). As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

Baseado no perfil de expressão gênica, secreção de proteínas e função, os macrófagos tem sido classificados em ativados da forma clássica (M1) ou ativados da forma alternativa (M2). A ativação clássica pode ser promovida por mediadores de linfócitos auxiliares T1, como LPS e interferon gama (IFN- γ), e é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico. A ativação alternativa ocorre por mediadores de linfócitos auxiliares T2, como interleucina 3 e 4, e apresenta características de expressão de arginases, proteinases e fatores imunossupressores. Em um estudo conduzido por Becker e colaboradores (2012), os autores buscaram identificar proteínas da membrana plasmática de macrófagos não ativados, polarizados (M1 e M2) e de células dendríticas, obtidos da medula óssea de camundongos C57BL/6J, utilizando para isso análise proteômica através de espectrofotometria de massa. As células foram cultivadas com fator estimulante de formação de colônias (M-CSF), para promover a proliferação celular, e sua diferenciação foi realizada através da exposição a INF- γ /LPS (polarização M1) ou interleucina-4 (polarização M2), sendo que

o sucesso desse procedimento foi confirmado através da análise de expressão de genes reconhecidos na literatura como marcadores de polarização de macrófagos. O estudo identificou 36 proteínas mais ou menos expressas de forma estatisticamente significativa para a ativação M1, 35 para a ativação M2 e 17 para células não diferenciadas. Entre essas, o receptor CD54 (ou ICAM-1) apresenta aumento significativo de expressão na polarização M1, e diminuição significativa dessa expressão na polarização M2 (BECKER *et al.*, 2012). Dessa forma, o resultado encontrado nesta dissertação evidenciando o aumento significativo da marcação do receptor CD54 na linhagem de macrófagos após o tratamento com os polissacarídeos em estudo é promissor, indicando que esses compostos podem estar estimulando a diferenciação das células pela via clássica M1, as quais possuem atividades anti-tumorais. A confirmação dessa diferenciação pode ser feita através da análise de outros marcadores de polarização de macrófagos, sendo essa uma perspectiva futura deste trabalho.

4.11.2 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) - Macrófagos

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas originadas principalmente da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Possuem ampla descrição de participação em situações fisiológicas e em doenças. Alguns exemplos de atuação em papéis fisiológicos são: em situações de hipóxia, a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria atua como um sensor de oxigênio disponível, liberando ROS em situações de falta de O₂, agindo como molécula de sinalização para a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1), o qual atua regulando o metabolismo em resposta a essa variável, importante, por exemplo, na indução à angiogênese; na atividade imune, a grande produção de ROS por macrófagos frente ao contato com patógenos serve como uma das primeiras linhas de defesa da resposta inata, e além disso, a grande quantidade de ROS presente no local aumenta a transdução de sinal de ativação dos linfócitos T, participando também da resposta imune adquirida. Em patologias, as ROS estão associadas, por exemplo, a processos inflamatórios agudos, levando ao agravamento da arteroesclerose, e ao câncer, induzindo danos ao DNA e promovendo assim a progressão tumoral (revisado

por ALFADDA; SALLAM, 2012).

Em ambas as concentrações testadas (10 e 100µg/mL) em 72h de tratamento, os dois polissacarídeos aumentaram de forma estatisticamente significativa a produção de espécies reativas de oxigênio na linhagem RAW 264.7, sendo esse aumento de 79.4% e 213% no composto CI, e de 313% e 630% no composto GB, como evidenciado pelo Gráfico 16.

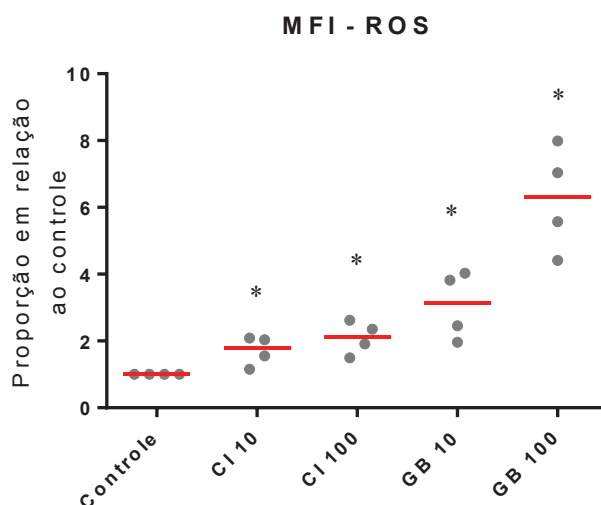


GRÁFICO 16 – Detecção de ROS. As células RAW 264.7 foram expostas a galactana da alga *Codium isthmocladum* ou a heteroramnana da alga *Gayralia brasiliensis* nas concentrações de 10 e 100µg/mL por 72h. Estes dados representam o resultado de quatro experimentos independentes, sendo que 10000 eventos em cada ensaio foram contabilizados em citometria de fluxo. A análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney (para * $p < 0,0286$). As linhas vermelhas representam a mediana dos dados.

Uma das possíveis implicações do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio é a indução à apoptose celular. A produção de ROS e a eliminação dos mesmos é altamente controlada nas células devido ao grande potencial destrutivo dessas moléculas altamente reativas. Catalases, superóxido desmutases e a glutathione peroxidase são algumas das moléculas anti-oxidantes que participam do equilíbrio redox intracelular. Em situações de estresse oxidativo (grande produção de ROS com baixa atividade anti-oxidante) a apoptose celular pode ser induzida por diferentes vias, como por exemplo por aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial. Esse processo ocorre devido a perda do potencial de membrana da mitocôndria, e pode induzir a

liberação de compostos pró-apoptóticos, como o citocromo C e pró-caspases (revisado por BRAS *et al.*, 2005). Dessa forma, a análise da viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 frente aos tratamentos com os polissacarídeos utilizados nesta dissertação precisa ser verificada, com os ensaios de MTT e VN ou então de apoptose/necrose celular por citometria de fluxo, por exemplo, para verificar se o aumento de ROS esta acompanhado à indução à morte celular. A análise da produção de ROS na linhagem B16-F10 também seria interessante, permitindo verificar se isso é uma modulação específica ou não.

Muitos artigos na literatura relatam o aumento de imunocompetência do organismo frente ao tratamento com polissacarídeos extraídos de diversas fontes naturais (ZONG *et al.*, 2012). O sistema imune inato tem papel importante nos mecanismos de defesa, e as ROS estão relacionadas à sua ativação. Um exemplo ocorre na ativação de macrófagos frente a lipopolissacarídeos (LPS). Quando o LPS interage com receptores do tipo *tool like receptors* (TLR), especialmente TLR-4, outras moléculas se associam a este, o que desencadeia uma cascata de sinalização, resultando na expressão de genes associados à diferenciação e ativação dos macrófagos. Entre essas moléculas da cascata de sinalização estão as ROS (KOHCHI *et al.*, 2008). A maior quantidade de ROS disponível para a resposta imune pode dessa forma representar maior ativação e atividade dos macrófagos.

O aumento da produção de ROS foi verificado nesta dissertação apenas na linhagem de macrófagos, e caso o aumento dessa atividade se repita em outras linhagens do sistema imune, uma modulação muito promissora seria encontrada. ROS auxiliam no processo de maturação de células dendríticas, provavelmente através de um mecanismo dependente de NF- κ B. Na ativação de células T, uma grande quantidade de ROS é detectada logo nos primeiros minutos, sugerindo um papel de sinalização mediado por essas moléculas (YANG *et al.*, 2013).

A análise da produção de ROS em macrófagos tratados com polissacarídeos é relatada na literatura. Em um estudo conduzido por Lee e colaboradores (2015) os autores verificaram a ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 (a mesma utilizada nesta dissertação) frente ao tratamento com um polissacarídeo obtido do fungo *Cordyceps militaris*. Entre alguns dos resultados apresentados, o composto não

diminuiu a viabilidade dos macrófagos nas concentrações de 10 a 200µg/mL, no período de 24h de tratamento, aumentou a produção de óxido nítrico (NO) e de ROS em relação ao controle (concentrações de 10 a 1000µg/mL), aumentou a capacidade fagocítica (avaliada por fagocitose de moléculas de dextran marcadas com FITC) e aumentou a secreção do fator de necrose tumoral TNF- α , sendo todos esses resultados estatisticamente significativos (LEE et al., 2015). Portanto, de forma semelhante ao encontrado no estudo de Lee e colaboradores, outras modulações promissoras podem ocorrer concomitantemente ao aumento da produção de ROS, o que faz com que a análise de possíveis alterações de outros parâmetros de ativação de macrófagos frente aos tratamentos com os polissacarídeos CI e GB sejam perspectivas futuras do estudo desses compostos.

O aumento da produção de ROS também é um possível indicador de polarização clássica (M1). Como citado anteriormente, esta forma de diferenciação está associada ao combate a patógenos e a atividade antitumoral, e entre seus marcadores estão a alta capacidade de apresentação de antígeno, grande produção de interleucinas 12 e 23 e grande produção de óxido nítrico e de moléculas reativas de oxigênio intermediárias (ROI, termo utilizado muitas vezes de forma intercambiável a ROS) (MONTOVANI et al, 2004). A sonda DCFH-DA utilizada para análise de ROS nesta dissertação não possui especificidade para os compostos super óxido que podem oxidar e então gerar fluorescência, sendo que até mesmo a produção de óxido nítrico pode ser evidenciado por ela (RAO et al, 1992). Desta forma, o resultado aqui evidenciado frente aos tratamentos com os polissacarídeos CI e GB corrobora com a hipótese de que esses compostos podem induzir a polarização clássica dos macrófagos expostos a eles nas concentrações e tempo testados.

A tabela abaixo (Tabela 2) apresenta um resumo dos resultados encontrados nesta dissertação.

TABELA 2: Resultados encontrados na presente dissertação.

		CI	GB
B16-F10	VN	1000µg/mL, 48h; 1, 10, 100 e 1000µg/mL, 72h ↓	100, 1000µg/mL, 48h; 100, 1000µg/mL, 72h ↓
	MTT	1, 100 e 1000µg/mL, 24h ↓	10, 100 e 1000µg/mL, 24h; 100, 1000µg/mL, 48h; 10, 100 e 1000µg/mL 72h ↓
	Proliferação	1, 10, 100 e 1000µg/mL, 48h ↓	1, 10, 100 e 1000µg/mL, 48h ↓
	Rhodamina	10 e 100µg/mL, 72h ↑	—
	Ciclo Celular	—	—
	MEV	—	Alteração
	Colônias	—	—
	Migração	—	100µg/mL, 72h ↓
	NG2	—	—
	N-Caderina	—	—
	CD44	—	10 e 100µg/mL, 72h ↓
RAW	CD54	100µg/mL, 72h ↑	10 e 100µg/mL, 72h ↑
	ROS	10 e 100µg/mL, 72h ↑	10 e 100µg/mL, 72h ↑

Seta vermelha: diminuição em relação ao controle; Seta Verde: aumento em relação ao controle
(Fonte: próprio autor).

5. CONCLUSÃO

O polissacarídeo GB apresenta resultados promissores frente ao modelo de estudo, gerando alterações morfológicas, diminuindo a migração celular e a marcação de CD44 na linhagem B16-F10, além de aparentemente induzir a ativação clássica de macrófagos, elegendo essa biomolécula para estudos posteriores.

O polissacarídeo CI não apresentou modulações nas dinâmicas tumorigênicas analisadas na linhagem B16-F10, mas aparenta induzir a ativação clássica de macrófagos. Outros ensaios, na mesma linhagem celular ou não, podem vir a evidenciar atividades antitumorais desse composto.

Diante dos resultados encontrados, pesquisas com esses polissacarídeos devem ser continuadas a fim de complementar os promissores dados já obtidos. A busca de outras moléculas moduladas pelos compostos pode evidenciar o mecanismo de ação dos mesmos frente as dinâmicas observadas, e ensaios *in vivo* podem gerar resultados ainda mais interessantes, sendo essas perspectivas futuras desse estudo.

REFERÊNCIAS

- ALE, Marcel Tutor et al. Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of Melanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 in Vitro. *Marine Drugs*, [s.l.], v. 9, n. 12, p.2605-2621, 13 dez. 2011.
- ALFADDA, Assim A.; SALLAM, Reem M.. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, [s.l.], v. 2012, n. 1, p.1-14, 2012.
- ARUFFO, A.; STAMENKOVIC, I.; MELNICK, M.; UNDERHILL, C.B.; SEED, B. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell*, v.61, p.1303-1313, 1990.
- BECKER, Lev et al. Unique Proteomic Signatures Distinguish Macrophages and Dendritic Cells. *Plos One*, [s.l.], v. 7, n. 3, p.1-12, 12 mar. 2012.
- BERNFIELD, Merton et al. Functions of cell surface Heparan sulfate proteoglycans. *Annual Reviews Of Biochemistry*. Massachusetts, United States, p. 729-777. jan. 1999.
- BERTÉ, Siliane Denise. HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS QUIMICAMENTE OBTIDAS DA MACROALGA VERDE *Gayralia brasiliensis*: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. 2013. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós- Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- BIE, Hongyu Zhang Ping et al. NG2/CSPG4 Proteoglycan as a Novel Prognostic Indicator and Therapeutic Target in Malignant Cancer. *Journal Of Stem Cell Research & Therapy*, [s.l.], v. 04, n. 02, p.1-12, jan. 2014
- BISCAIA, Stelée M. P. Avaliação da atividade biológica in vitro de polissacarídeos obtidos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.
- BRAS, M. Le et al. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology And Histopathology*, [s.i.], v. 20, n. 1, p.205-220, jan. 2005.
- CALEY, Andrew; JONES, Rob. The principle of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery*. Reino Unido, p. 186-190. 2012.
- CAMPBELL, Iain D.; HUMPHRIES, Martin J.. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Oxford, v. 3, p.1-15, jan. 2011.
- CASSOLATO, Juliana E. F. et al. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydrate*

Research. [s.l.], p. 3085-3095. 24 set. 2008.

CHALKIADAKIA, Georgia et al. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*. Greece, p. 1323-1331. 6 dez. 2008.

CHAMBERS, Ann F.; GROOM, Alan C.; MACDONALD, Ian C.. Dissemination And Growth Of Cancer Cells In Metastatic Sites. *Nature Reviews: Cancer*. London, p. 563-572. ago. 2002

CHATELAIN, Cle'ment; CIARLETTA, Pasquale; AMAR, Martine Ben. Morphological changes in early melanoma development: Influence of nutrients, growth inhibitors and cell-adhesion mechanisms. *Journal Of Theoretical Biology*. Paris, France, p. 46-59. 1 set. 2011.

CHEN, Guochuang et al. Polysaccharides from *Rhizopus nigricans* mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 97, n. 2, p.800-808, set. 2013.

CICHOREK, Mirosława et al. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology*, [S.l.], v1, n.30, p. 30-41, 20 fev. 2013.

COHEN, Cynthia et al. Mitogen-activated Protein Kinase Activation Is an Early Event in Melanoma Progression. *Clinical Cancer Research*. Georgia, United States, p. 3728-3733. dez. 2002.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Rio Grande do Norte, Brasil, p. 21-28. 08 set. 2010.

Cuevas C, Francesch A. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports*, 2009;26:322–37.

Demers, A.A.; Nugent, Z. Mihalcioiu', C. et al. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J Am Acad Dermatol*, v.53, p.320–328, 2005;.

DIAS, Paulo Fernando et al. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, [s.l.], v. 56, n. 4, p.436-446, 18 maio 2005.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 1976, v.70, p.645-647.

D'INCALCI, Maurizio; GALMARINI, Carlos M.. A Review of Trabectedin (ET-743): A

Unique Mechanism of Action. Molecular Cancer Therapeutics. Italia, p. 2157-2163. ago. 2010.

DOHERTY, Mark K; MORRIS, Patrick G. Eribulin for the treatment of metastatic breast cancer: an update on its safety and efficacy. International Journal Of Women's Health. Irlanda, p. 47-58. jan. 2015.

DUNKI-JABOCS, Erik M.. Current Management of Melanoma. Current Problems In Surgery. United States, p. 351-382. abr. 2013.

FARIAS, Eduardo H C et al. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. Glucobiology, Oxford, v. 18, n. 3, p.250-259, 3 jan. 2008.

FACINA, Taís (Ed.). Estimativa 2014: incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2014. 124 p.

FAN, Yanli et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. Carbohydrate Polymers. China, p. 1313-1318. 14 fev. 2012.

FIDLER, Isaiah J.. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature Reviews: Cancer. Houston, p. 1-6. jun. 2001.

FIEBER, Christina et al. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. Journal Of Cell Science. Germany, p. 359-367. 13 ago. 2003.

FRANKEN, Nicolaas A P et al. Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols, [s.l.], v. 1, n. 5, p.2315-2319, dez. 2006.

FUSTER, Mark M. et al. Genetic alteration of endothelial heparan sulfate selectively inhibits tumor angiogenesis. The Journal Of Cell Biology. United States, p. 539-549. 7 maio 2007.

GANESAN, Ponesakki et al. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. Biochimica Et Biophysica Acta. Kyoto, Japan, p. 497-503. 01 mar. 2011.

GALMARINI, Darío; GALMARINI, Carlos M.; GALMARINI, Felipe C.. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. Critical Reviews In Oncology Hematology. Buenos Aires, p. 181-199. 7 mar. 2012.

GANDHI, N.S.; MANCERA, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Chem Biol & Drug Des, v. 72, n. 6, p. 455-82, 2008.

GARBE, Claus et al. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current

Status and Future Prospects. *The Oncologist*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.5-24, 1 jan. 2011

Gebäck, T., Schulz, M.M.P., Koumoutsakos, P. & Detmar, M. A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* (2008).

GILLIES, Robert J; DIDIER, N; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, Colorado, v. 1, n. 159, p.109-113, abr. 1986.

GORDON, Randy. Skin Cancer: An Overview Of Epidemiology And Risk Factors. *Seminars In Oncology Nursing*, Alabama, v. 29, n. 3, p.160-169, ago. 2013.

GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T.; ABUD, A.P.R.; SENE, R.V. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcareia carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. *BMC Cancer*, v. 10, p. 113, jan. 2010.

HAASS, Nikolas K.; HERLYN, Meenhard. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. *Journal Of Investigative Dermatology*. Pennsylvania, United States, p. 153-163. nov. 2005.

HARBOUR, J. W.. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & Development*, [s.l.], v. 14, n. 19, p.2393-2409, 1 out. 2000

HASSAN, Mohamed et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, [S.I.], v.2014, p. 1-23. Jun.2014.

HERNANDEZ-YAGO, Jose et al. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, Kansas, v. 151, n. 1, p.568-573, fev. 1988.

HOOD, John D.; CHERESH, David A.. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 2, n. 2, p.91-100, fev. 2002.

JACKSON, Katrina L.; HENDERSON, James A.; PHILLIPS, Andrew J.. The Halichondrins and E7389. *Chemical Reviews*. Colorado, p. 3044-3079. jun. 2009.

JAQUES, L.B.; BALLIEUX, R.E.; DIETRICH, C.P.; KAVANAGH, L.W. A microeletroforese method for heparin. *Can.J. Physiol. Pharmacol.*, 1968, v.46, p.345-360.

JIAO, Lili et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. *International Immunopharmacology*, [s.l.], v. 9, n. 3, p.324-329, mar. 2009.

JIN, Jun-o et al. The Mechanism of Fucoidan-Induced Apoptosis in Leukemic Cells: Involvement of ERK1/2, JNK, Glutathione, and Nitric Oxide. *Molecular Carcinogenesis*.

Korea, p. 771-782. 22 jun. 2010.

KALLURI, Raghu; WEINBERG, Robert A.. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal Of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 119, n. 6, p.1420-1428, 1 jun. 2009.

KARNJANAPRATUM, Supatra; YOU, Sangguan. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *International Journal Of Biological Macromolecules*. Republic Of Korea, p. 311-318. 8 dez. 2011.

KESSENBROCK, Kai; PLAKS, Vicki; WERB, Zena. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. San Francisco, United States, p. 52-67. 2 abr. 2010.

KIM, Kil-nam et al. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16-F10 cells. *Environmental Toxicology And Pharmacology*. Republic Of Korea, p. 39-46. 13 out. 2012.

KWON, Mi-jin; NAM, Taek-jeong. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biology International*. South Korea, p. 768-775. 17 jan. 2007.

KOHCHI, Chie et al. ROS and Innate Immunity. *Anticancer Research*, [s.i.], v. 29, n. 1, p.817-822, ago. 2008.

KOLA, Ismail; LANDIS, John. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews: Drug Discovery*. New Jersey, p. 711-715. ago. 2004.

LAWSON, Charlotte; WOLF, Sabine. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*. [s.i.], p. 22-32. jan. 2009.

LEE, Ki et al. Polysaccharide from *Inonotus obliquus* inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway. *Oncology Reports*, [s.l.], v. 31, n. 3, p.2447-2453, 21 mar. 2014.

LEE, Jong Seok et al. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 120, n. 1, p.29-37, abr. 2015.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329-33, jan. 2007.

LIU, Chunhui et al. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydrate Polymers*, Nanjing, v. 67, n. 1, p.313-318, jul. 2006.

LUO, Bing-hao; CARMAN, Christopher V.; SPRINGER, Timothy A.. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. Annual Review Of Immunology. Massachusetts, United States, p. 619-647. ago. 2007.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. Apoptosis. [S.l.] v.8, p.115-128, 2003.

MAKAGIANSAR, Irwan T. et al. Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC α helps balance cell proliferation and migration.

MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends In Biochemical Sciences,[s.l.], v. 30, n. 11, p.630-641, nov. 2005.

MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nature Immunology, [s.l.], v. 11, n. 10, p.889-896, 20 set. 2010.

MARINI, Alessandra et al. Epigenetic Inactivation of Tumor Suppressor Genes in Serum of Patients with Cutaneous Melanoma. Journal Of Investigative Dermatology.Dusseldorf, Germany, p. 422-431. 22 out. 2005.

MATHIAS, Rommel A.; GOPAL, Shashi K.; SIMPSON, Richard J.. Contribution of cells undergoing epithelial–mesenchymal transition to the tumour microenvironment.Journal Of Proteomics. New Jersey, p. 545-557. out. 2012.

MAVERAKIS, Emanuel et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. Acta Dermato Venereologica, [s.l.], v. 95, n. 5, p.516-524, jan. 2015

MCKIM JUNIOR, James M.. Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, Kalamazoo, v. 13, n. 2, p.188-206, jan. 2010.

MEIER, Friedegund et al. Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or b3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. Experimental Dermatology.United States, p. 296-306. 6 mar. 2003.

MIZUNO, Hiromi et al. Changes in adhesive and migratory characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) cells induced by expression of $\alpha 3\beta 1$ integrin. Biochimica Et Biophysica Acta. Toyko, Japan, p. 564-570. 25 set. 2007

MONTOVANI, Alberto et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends In Immunology, [s.l.], v. 25, n. 12, p.677-686, dez. 2004.

MOSTAFAPOUR, Asma et al. Polysaccharides isolated from ophiocoma erinaceus to inhibits cell growth and induces cellular differentiation and apoptosis in B16-F10

melanoma cells. Trends In Life Sciences. (s.i.), p. 50-57. jan. 2015.

MULLIKEN, Jennifer S.; RUSSAK, Julie E.; RIGEL, Darrell S.. The Effect of Sunscreen on Melanoma Risk. Dermatol Clinics. New York, p. 369-376. abr. 2012.

NAOR, David et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. Seminars In Cancer Biology, [s.l.], v. 18, n. 4, p.260-267, ago. 2008.

NARAYANAN, Deevya L.; SALADI, Rao N.; FOX, Joshua L.. Ultraviolet radiation and skin cancer. International Journal Of Dermatology. New York, p. 978-986. 2010.

Nauts, H.C., Swift, W.E. and Coley, B.L. (1946) The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. Cancer Res 6, 205–216.

NOVAES, MRC Gs, Valadares F, Reis, MC, Goncalves D R, Marilia da Cunha Menezes, MC. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence-based medicine. CLINICS, 66(12):2133-2139, 2011.

OLIVEIRA-CARVALHO, Maria de Fátima de; PEREIRA, Sonia Maria Barreto; PEDROCHE, Francisco Flores. Taxonomy and distribution of the green algal genus *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. Nova Hedwigia, Stuttgart, v. 91, n. 1, p.87-109, ago. 2010.

PARK, Hyun Soo et al. Antiproliferative Activity of Fucoidan Was Associated with the Induction of Apoptosis and Autophagy in AGS Human Gastric Cancer Cells. Journal Of Food Science. Republic Of Korea, p. 77-83. 29 nov. 2010.

PARK, Hye-jin; HAN, Eun Su; PARK, Dong Ki. The ethyl acetate extract of PGP (*Phellinus linteus* grown on *Panax ginseng*) suppresses B16-F10 melanoma cell proliferation through inducing cellular differentiation and apoptosis. Journal Of Ethnopharmacology,[s.l.], v. 132, n. 1, p.115-121, out. 2010.

PELLIZZARI, Franciane et al. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. Botanica Marina, São Paulo, v. 56, n. 2, p.197-205, maio 2013.

PETIT, Valérie; THIERY, Jean-paul. Focal adhesions: structure and dynamics. Biology Of The Cell. Switzerland, p. 477-494. 6 nov. 2000.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion test for cell viability. In: P.F. Kruse, Editor, Tissue Culture, Academic Press, New York, pp. 407–408. 1973.

PONTA, Helmut; SHERMAN, Larry; HERRLICH, Peter A.. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. Nature Reviews Molecular Cell Biology, [s.l.], v. 4, n.

1, p.33-45, jan. 2003.

RAO, K. Murali Krishna et al. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *Journal Of Leukocyte Biology*. [s.i], p. 496-500. maio 1992.

ROPELLATO, Juliana et al. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. *Carbohydrate Polymers*. Curitiba, p. 476-485. 25 set. 2014.

REPETTO, Guillermo; PESO, Ana del; ZURITA, Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. Seville, p. 1125-1131. jun. 2008.

RENN, Donald. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Tibtech*. Massachusetts, United States, p. 9-14. jan. 1997.

RUSSAK, Julie E.; RIGEL, Darrel S.. Risk Factors for the Development of Primary Cutaneous Melanoma. *Dermatol Clinics*, New York, v. 30, n. 2, p.363-368, maio 2012

SCHEUER PJ. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential. *Science* 1990; 248:173–7.

SCHUMACHER, Marc et al. Gold from the sea: Marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnology Advances*. Luxemburgo, p. 531-547. 22 fev. 2011.

SEKULIC, Aleksandar et al. Malignant Melanoma in the 21st Century: The Emerging Molecular Landscape. *Mayo Clinic Proceedings*. Arizona, United States, p. 825-846. jul. 2008.

SHETTY, Nishitha; GUPTA, Sudeep. Eribulin drug review. *South Asian Journal Of Cancer*. India, p. 57-59. jan. 2014.

SHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin câncer – A review. *Mutation Research*, Heidelberg, Germany, n.705, p. 141-153, 2010.

SIMON, John D. et al. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Research*. Japan, p. 563-579. 16 jul. 2009.

STERN, Robert. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars In Cancer Biology*. Jerusalem, p. 275-280. 2008.

STEWART, Bernard W.; WILD, Christopher P. (Ed.). *World Cancer report: 2014*. 2014. ed. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2014. 953 p.

SUDHAKAR, Akulapalli. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. Journal Of Cancer Science & Therapy. Omaha, p. 1-4. ago. 2009.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. Current Pharmaceutical Design. Llobregat, p. 3-10. jan. 2010.

VAIOPOULOS, Aristeidis G.; ATHANASOULA, Kalliopi Ch.; PAPAVALASSILIOU, Athanasios G.. Epigenetic modifications in colorectal cancer: Molecular insights and therapeutic challenges. Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease. Athens, p. 971-980. 20 fev. 2014.

VAYSSADE, Muriel et al. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16-F10 melanoma cells. Phytother. Res., [s.l.], v. 24, n. 1, p.982-989, set. 2009.

VOELCKER, Verena et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. Experimental Dermatology. Germany, p. 100-107. 14 set. 2008

VOULGARI, Angeliki; PINTZAS, Alexander. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. Biochimica Et Biophysica Acta: Reviews on Cancer. Athens, p. 75-90. 21 abr. 2009.

WANG, Nan et al. A polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge improves immunefunction in gastric cancer rats. Carbohydrate Polymers. China, p. 47-55. 26 abr. 2014.

WANG, Weilan et al. Suppression of Tumor Growth by *Pleurotus ferulae* Ethanol Extract through Induction of Cell Apoptosis, and Inhibition of Cell Proliferation and Migration. Plos One. China, p. 1-14. jul. 2014.

WEINBERG, R. A. The biology of cancer: Second Ed.. Nova York: Garland Science, 963 p., 2014.

WHEELLOCK, M. J.; SHINTANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; JOHNSON, K. R. Cadherin switching. Journal of cell science, v. 121, p. 727–735, 2008.

WEISSGERBER, Tracey L. et al. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. Plos: biology. Minnessota, p. 1-10. abr. 2015.

WEHRLE-HALLER, Bernhard; A IMHOF, Beat. Integrin-dependent pathologies. Journal Of Pathology. Geneva, Switzerland, p. 481-487. jan. 2003.

WENDY GUIRY IN GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>;

acessado em 14 Abril 2015.

WIJESEKARAA, Isuru; PANGESTUTIA, Ratih; KIMA, Se-kwon. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*. Republic Of Korea, p. 14-21. 2 nov. 2010.

YAMAGUCHI, Hideki; WYCKOFF, Jeffrey; CONDEELIS, John. Cell migration in tumors. *Current Opinion In Cell Biology*. [s.i], p. 559-564. ago. 2008.

YANG, Jing; WEINBERG, Robert A.. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Cell Press: Developmental Cell*. San Diego, p. 818-829. jun. 2008.

YANG, Yuhui et al. Reactive Oxygen Species in the Immune System. *International Reviews Of Immunology*, [s.l.], v. 32, n. 3, p.249-270, 25 abr. 2013.

YANG, Yong-jing; XU, Han-mei; SUO, You-rui. Raspberry pulp polysaccharides inhibit tumor growth via immunopotential and enhance docetaxel chemotherapy against malignant melanoma in vivo. *Food Funct.*, [s.l.], v. 6, n. 9, p.3022-3034, 2015

YU, Jie et al. Auricularia polytricha polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *International Journal Of Biological Macromolecules*. China, p. 67-71. 19 abr. 2014.

YU, Qin; STAMENKOVIC, Ivan. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, [s.i], v. 13, n. 1, p.35-48, 5 set. 1999.

YU, Qin; STAMENKOVIC, Ivan. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*. Massachusetts, United States, p. 163-176. 7 dez. 1999.

Yu, Z.; Ming, G.; Kaiping, W.; Zhixiang, C.; Liquan, D.; Jingyu, L.; Fang, Z. Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, v. 81, n. 8, p. 1163-1170, 2010.

ZAIDI, M. Raza; DAY, Chi-ping; MERLINO, Glenn. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal Of Investigative Dermatology*, [s.l.], v. 128, n. 10, p.2381-2391, out. 2008.

ZHANG, Min et al. Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sciences*, Tianjin, v. 76, n. 1, p.2115-2124, maio 2004.

ZHANG, Ning et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis. *Cancer Science*, [s.l.], v. 101, n. 11, p.2375-2383, 16 jul. 2010.

ZHAO, Jie et al. Inhibition of $\alpha 4$ integrin mediated adhesion was involved in the reduction of B16-F10 melanoma cells lung colonization in C57BL/6 mice treated with Gambogic acid. *European Journal Of Pharmacology*. Republic Of China, p. 127-131. 9 maio 2008.

ZONG, A., CAO, H., & WANG, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1395–410.